

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-
Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Thomas Ruzicka

**Evaluierung von Bcl-2-Molekülen
zur spezifischen proapoptotischen Therapie
des malignen Melanoms**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Daniela Senft

aus Ingolstadt
2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Carola Berking
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Simon Rothenfuß Priv. Doz Dr. Ulrich C Schaller
Betreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. rer. biol. hum. Robert Besch
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. Maximilian Reiser FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	26.04.2012

**Evaluierung von Bcl-2-Molekülen
zur spezifischen proapoptotischen Therapie
des malignen Melanoms**

Teile dieser Arbeit sind Bestandteil folgender Publikationen:

Abstracts:

Besch R, Poeck H, Hohenauer T, Senft D, Häcker G, Hornung V, Rothenfusser S, Hartmann G

Melanoma cells are susceptible to the proapoptotic signaling of the virus-sensing receptors RIG-I and Mda5.

Pigment Cell Melanoma Res 2009; 22: 860-906

Senft D, Berking C, Besch R

Role of antiapoptotic Bcl-2 family members in the survival of melanoma cells and primary human skin cells.

Pigment Cell Melanoma Res 2009; 22: 860-906

Senft D, Berking C, Besch R

Role of antiapoptotic Bcl-2 family members in the survival of melanoma cells and non-malignant human skin cells.

Experimental Dermatology 2011; 20: 162-216

Originalarbeit:

Besch R*, Poeck H*, Hohenauer T, Senft D, Häcker G, Berking C, Hornung V, Endres S, Ruzicka T, Rothenfusser S, Hartmann G.

Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells.

J Clin Invest. 2009 Aug;119:2399-411. * trugen zu gleichen Teilen bei.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	1
1.1. Die Apoptose	1
1.1.1. Molekulare Mechanismen der Apoptoseregulation	2
1.1.1.1. <i>Der extrinsische und intrinsische Apoptoseweg</i>	<i>3</i>
1.1.1.2. <i>Regulation der intrinsischen Apoptose durch die Bcl-2-Proteinfamilie</i>	<i>5</i>
1.1.2. Die Rolle der Apoptose in der Tumorgenese und Tumorthherapie	10
1.2. Das maligne Melanom.....	11
1.2.1. Molekulare Grundlagen der Melanomentstehung	12
1.2.2. Therapie des malignen Melanoms	14
1.2.2.1. <i>Klassische Therapieansätze.....</i>	<i>14</i>
1.2.2.2. <i>Neue Therapiekonzepte</i>	<i>15</i>
1.3. Strategien zur Überwindung der Apoptoseresistenz.....	15
1.4. Ziele der Arbeit	17
2. MATERIAL UND METHODEN	18
2.1. Material.....	18
2.1.1. Zellkulturmedien	18
2.1.2. Transfektionsreagenzien	18
2.1.3. Oligonukleotide.....	19
2.1.3.1. <i>Small Interfering RNAs (siRNAs).....</i>	<i>19</i>
2.1.3.2. <i>Oligonukleotide für die In-Vitro-Transkription</i>	<i>19</i>
2.1.3.3. <i>Primer und Sonden für die quantitative RT-PCR.....</i>	<i>20</i>
2.1.4. Plasmide.....	20
2.1.5. Antikörper	21
2.1.6. Kommerziell erhältliche Komplettsysteme.....	22
2.1.7. Apparative Ausstattung	22
2.1.8. Puffer und Lösungen	23
2.2. Methoden	26
2.2.1. Zellkultur und zellbasierte Assays	26
2.2.1.1. <i>Kultivierung von Zellen</i>	<i>26</i>
2.2.1.2. <i>Hemmung der Genexpression mittels RNA-Interferenz (RNAi)</i>	<i>26</i>
2.2.1.3. <i>Transfektionen.....</i>	<i>27</i>
2.2.1.4. <i>Retroviraler Gentransfer: Generierung NF-κB-defizienter Zellen</i>	<i>28</i>

3.2.3.1. <i>ABT sensibilisiert Fibroblasten für pppRNA und poly(I:C)</i>	57
3.2.3.2. <i>Die Hemmung von Bcl-xL sensibilisiert primäre Zellen für die Apoptoseinduktion durch virusähnliche RNAs</i>	57
3.3. Transkriptionelle Regulation von Noxa nach der Behandlung mit pppRNA	59
3.3.1. Der Promotorbereich von Noxa	59
3.3.2. Die pppRNA-vermittelte Noxa-Induktion ist unabhängig von p53 und HIF1 α	60
3.3.3. Die pppRNA-vermittelte Noxa-Induktion ist unabhängig von dem kanonischen NF- κ B-Signalweg	62
3.3.4. Die CRE- und IRF-Bindestellen sind wichtig für die Noxa-Induktion	64
4. DISKUSSION	68
4.1. Die Rolle antiapoptotischer Bcl-2-Proteine in Melanomzellen und nicht-malignen Hautzellen	69
4.1.1. Expressionsanalyse antiapoptotischer Bcl-2-Proteine	69
4.1.2. Melanomspezifische Zelltodinduktion durch das gezielte Angreifen von Mcl-1 und A1	70
4.1.3. Die Hemmung von Mcl-1 und A1 in Kombination mit anderen therapeutischen Ansätzen	73
4.1.4. Mcl-1 und A1 als therapeutische Angriffspunkte: Klinisches Potential und Ausblick	73
4.2. Virusähnliche RNAs führen zur melanomspezifischen Apoptoseinduktion	74
4.2.1. Bcl-xL schützt nicht-maligne Zellen vor der Apoptoseinduktion durch virusähnliche RNAs	76
4.2.2. Transkriptionelle Regulation von Noxa nach Stimulation mit virusähnlichen RNAs	78
4.2.3. pppRNA als therapeutisches Molekül: Klinische Relevanz und Ausblick	79
ZUSAMMENFASSUNG	83
LITERATURNACHWEIS	86
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	96
DANKSAGUNG	98
LEBENS LAUF	99

1. Einleitung

Die Entstehung von Krebs ist ein komplexer Prozess, bei dem genetische und epigenetische Veränderungen akkumulieren, die den betroffenen Zellen einen Wachstumsvorteil verschaffen. Durch die Erforschung dieser Veränderungen in Krebszellen konnten in den vergangenen Jahrzehnten eine Vielzahl an Onkogenen und Tumorsuppressorgenen identifiziert werden. Es hat sich gezeigt, dass diese Mutationen in den meisten, wenn nicht in allen der über 100 bekannten Tumoren, im Wesentlichen zum Erwerb von sechs Eigenschaften führen, die für die Entstehung von malignem Gewebe essentiell sind: (1) Sie ermöglichen, dass Tumorzellen unabhängig von Wachstumssignalen proliferieren, und (2) eine Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumsinhibitoren aufweisen. Weiterhin haben maligne Zellen im Gegensatz zu ihren gesunden Vorläuferzellen ein (3) unbegrenztes replikatives Potential, und können (4) die Gefäßneubildung (Angiogenese) fördern, um eine Nährstoff- und Sauerstoffversorgung des Tumorgewebes zu gewährleisten. Außerdem entwickeln Tumorzellen während der malignen Transformation (5) das Potential, in benachbartes Gewebe einzuwandern (Invasion), wodurch schließlich die Metastasierung ermöglicht wird. Mit der Entdeckung des Bcl-2-Onkogens, das nicht wie die bis dahin bekannten Onkogene die Proliferation fördert, sondern ein Sterben entarteter Zellen verhindert, wurde eine weitere Eigenschaft von Tumorzellen erkannt, (6) die Resistenz gegenüber der Apoptose [1].

1.1. Die Apoptose

Der Begriff Apoptose (aus dem griechischen von *apo* „weg“ und *ptosis* „fallen“) bezeichnet das Abfallen von Blättern im Herbst und wurde erstmals 1972 von Kerr, Wyllie und Currie eingeführt, als sie eine Art des Zelltodes beschrieben, die sich durch Abrundung und Schrumpfung der Zelle, Kondensation und Abbau des Chromatins und der Abschnürung des Zellinhalts in membranumschlossene Vesikel (apoptotische Körperchen) von dem bis dahin bekannten Zelltod, der Nekrose abgrenzt [2]. Eine weitere Eigenschaft dieser neu entdeckten Art des Zellsterbens war zum einen die Selektivität, das heißt einzelne Zellen eines Gewebes können kontrolliert sterben. Außerdem wird bei der Apoptose im Gegensatz zur Nekrose eine Entzündungsreaktion umgangen, da kein Zellinhalt freigesetzt wird, denn die Überreste der geschrumpften und in apoptotische Körperchen zerfallenen Zelle werden durch Phagozytose eliminiert. Diese Beobachtungen revolutionierten die bis dahin gängige Meinung, dass der Zelltod Resultat einer Verletzung sei und führten schließlich zu dem heutigen Verständnis, dass der programmierte Zelltod Grundvoraussetzung für die normale Entwicklung und Erhaltung mehrzelliger Lebewesen ist.

Während der Embryogenese ist die Apoptose für die Entfernung primär angelegter Strukturen, die im Laufe der Entwicklung nicht mehr benötigt werden, verantwortlich. Zum Beispiel gehen überschüssig gebildete Neurone während der pränatalen Gehirnentwicklung durch apoptotische Prozesse zugrunde.

Im ausgewachsenen Organismus ist die Apoptose essentiell für die Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase – eine Neubildung von Zellen setzt eine Elimination nicht mehr benötigter Zellen voraus. Zudem stellt die Apoptose einen Schutzmechanismus dar. Sie ist für die Entfernung irreparabel geschädigter Zellen (DNA-Schäden) verantwortlich und ist ein Schlüsselmechanismus des betroffenen Organismus in der Bekämpfung von Viren und anderen Infektionen [3].

Die Apoptose ist ein ständig ablaufender Prozess, dessen Notwendigkeit erst bei Defekten in den apoptotischen Signalwegen deutlich wird, die schwerwiegende pathologische Zustände zur Folge haben. Eine gesteigerte Apoptoserate in Zellen, die ein geringes Regenerationspotential besitzen oder nicht ersetzt werden können, führt zur Entstehung degenerativer Erkrankungen wie Alzheimer oder Diabetes. Eine erhöhte Apoptoserate ist auch für CD4-positive T-Zellen bei AIDS charakteristisch. Können wiederum Zellen mit schädigendem Potential nicht eliminiert werden, führt dies beispielsweise zu autoreaktiven T-Lymphozyten, also zur Ausbildung von Autoimmunerkrankungen, oder fördert die maligne Transformation und Metastasierung [3].

1.1.1. Molekulare Mechanismen der Apoptoseregulation

Um die Entstehung und Erhaltung eines gesunden Organismus zu gewährleisten, muss die Apoptose streng reguliert werden. Das Prinzip der Apoptose lässt sich in allen mehrzelligen Organismen wieder finden und ist in dem Nematoden *C. elegans* ausführlich untersucht worden. Während der Entwicklung des hermaphroditischen Fadenwurms werden 1090 somatische Zellen gebildet, von denen wiederum genau 131 Zellen durch Apoptose absterben und der adulte Organismus dann aus exakt 959 Zellen besteht. Dieser Prozess wird hauptsächlich durch die Interaktion von vier Proteinen, namentlich CED3, CED4, CED9 und Egl-1 reguliert [4]. Hierbei weisen CED3 und CED4 eine proapoptotische Wirkung auf, welche durch die Bindung des Apoptose-Inhibitors CED9 gehemmt wird. Der Regulator Egl-1 kann CED9 binden und somit dessen antiapoptotische Funktion aufheben. Hierdurch wird die Protease CED3 an CED4 aktiviert und der Zelltod durch proteolytische Spaltung wichtiger Zellorganellen vollzogen. Dieses Grundprinzip ist evolutionär konserviert, doch ist mit zunehmender Komplexität des Organismus auch die Regulation der Apoptose komplexer. Es wurden im Säugetier homologe Proteine entdeckt, welche diese Aufgaben übernehmen.

Wie in *C. elegans* wird auch in Säugerzellen die Apoptose durch den proteolytischen Abbau wichtiger Zellorganellen durch Proteasen ausgeführt. Apoptotische Stimuli führen zur Aktivierung von Cystein-abhängigen Aspartat-spezifischen Proteasen, den sogenannten Caspasen. Die humane Caspasenfamilie umfasst 11 Mitglieder, die anhand ihrer Substratspezifität in zwei Gruppen untergliedert werden. Die erste Gruppe stellen die inflammatorischen Caspasen dar, welche für die posttranslationale Modifikation von Zytokinen verantwortlich sind. Die zweite Gruppe ist an der Apoptose beteiligt und besteht aus den sogenannten apoptotischen Caspasen. Die apoptotischen Caspasen lassen sich anhand ihrer Funktion weiterhin in zwei Subgruppen untergliedern, die Initiator- und die

Effektorcaspasen [5]. Wie alle Caspasen liegen auch die apoptotischen Caspasen in der Zelle als inaktive Proenzyme (Procaspasen) vor und werden stimulusabhängig durch proteolytische Spaltung kaskadenartig aktiviert.

Am Anfang der apoptotischen Caspasenkaskade stehen die Initiatorcaspasen, zu welchen Caspase 2, Caspase 8, Caspase 9 und Caspase 10 gezählt werden. Initiatorcaspasen werden durch apoptotische Stimuli an Adapterproteine rekrutiert, wodurch sie autokatalytisch aktiviert werden. Hierbei werden die Procaspasen mit multimeren Adapterproteinen assoziiert, wodurch die Konformation der Procaspasen verändert wird. Die Konformationsänderung führt dazu, dass die katalytischen Zentren der Enzyme in eine aktive Position gebracht werden, sodass eine autokatalytische Prozessierung der Procaspasen stattfinden kann [5, 6]. Die Aufgabe aktivierter Initiatorcaspasen ist es, das apoptotische Signal an die Effektorcaspasen weiterzuleiten.

Die Effektorcaspasen werden als die ausführende Kraft des apoptotischen Programms angesehen und zu ihren Mitgliedern zählen die Caspase 3, Caspase 6 und Caspase 7. Auch die Effektorcaspasen liegen in der Zelle als Proenzyme vor und werden von den Initiatorcaspasen durch proteolytische Spaltung aktiviert. Zu den Substraten der Effektorcaspasen zählen beispielsweise Aktin, Lamin sowie Nukleasen, durch deren Spaltung die morphologischen Veränderungen während der Apoptose herbeigeführt werden. Außerdem spalten die Caspasen Apoptose-Regulatoren, wodurch Überlebenssignale unterdrückt und apoptotische Signale verstärkt werden [7].

Um einem unerwünschten Zelltod vorzubeugen, wird die Aktivierung der Caspasen streng reguliert. Prinzipiell wird die Aktivität der Caspasen über zwei Mechanismen gesteuert. Zum einen existieren sogenannte *Inhibitor of Apoptosis* Proteine (IAPs) die verhindern, dass irrtümlich aktivierte Caspasen die Apoptose auslösen. Wichtige Vertreter der IAP-Familie sind XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP und Survivin. Diese Proteine können die Effektorcaspasen hemmen, indem sie mit der für die Proteinfamilie typischen BIR-Domäne mit dem katalytischen Zentrum der Effektorcaspasen interagieren [8, 9]. Der zweite Weg, die Caspasenkaskade zu regulieren, führt über die Bildung der für die Aktivierung der Initiatorcaspasen notwendigen Adapterproteinkomplexe. Die Bildung dieser Komplexe wird wiederum über zwei Signaltransduktionswege streng kontrolliert, den extrinsischen und den intrinsischen Apoptoseweg.

1.1.1.1. Der extrinsische und intrinsische Apoptoseweg

Die Aktivierung der Initiatorcaspasen 8 und 10 erfolgt über den extrinsischen Apoptoseweg. Wegen der extrazellulären Signale, die an sogenannte Todesrezeptoren binden, wird der extrinsische Apoptoseweg auch todesrezeptorvermittelte Apoptose genannt. Die membranständigen Todesrezeptoren und ihre Liganden sind Mitglieder der *Tumor Necrosis Factor* (TNF) - Superfamilie. Zu den Todesrezeptoren zählen unter anderem Fas (CD95), TNF-R1, TRAIL-R1 und TRAIL-R2. Zu den Liganden werden zum Beispiel der Fas-Ligand, TNF oder TRAIL gezählt. Am besten untersucht ist die Fas/CD95-induzierte Apoptose, anhand derer im Folgenden die Grundprinzipien des Todesrezeptorsignalwegs beschrieben

werden (Abbildung 1). Die Bindung der Todesliganden an den jeweiligen Rezeptor führt zur Trimerisierung der Rezeptoren. Die hieraus resultierende Konformationsänderung ermöglicht es dem Adapterprotein FADD, über die eigene Todesdomäne an die intrazelluläre Todesdomäne des Rezeptors zu binden und Procaspase-8/10 an den Rezeptor zu rekrutieren. Dieser Komplex aus aktiven Rezeptoren, FADD und den Procaspasen wird als *Death-inducing Signaling Complex* (DISC) bezeichnet. Die Formation des DISC führt zu der, für die autokatalytische Spaltung der Procaspasen nötigen Konformationsänderung und schließlich zur Freisetzung proteolytisch aktiver Caspase 8, die für die Aktivierung der Effektorcaspasen verantwortlich ist [10].

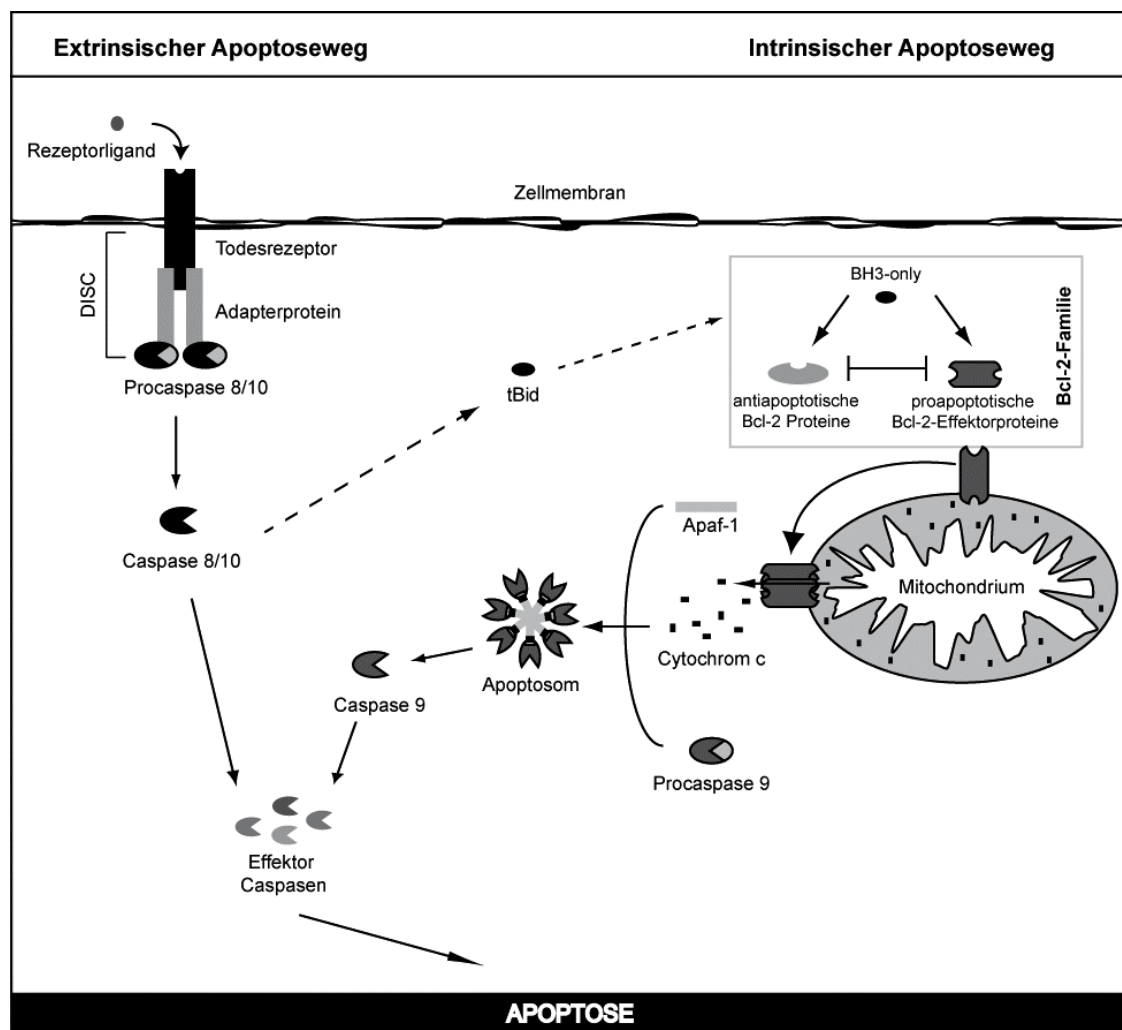


Abbildung 1: Die Hauptsignalwege der Apoptose

Der extrinsische Apoptoseweg: Durch Ligandenbindung kommt es zur Rezeptoroligomerisierung und Rekrutierung der Adapterproteine. Der daraus resultierende *Death-inducing Signaling Complex* (DISC) führt zur Rekrutierung der Procaspasen 8/10 und zu deren Prozessierung. Die so aktivierten Caspasen 8/10 spalten die Effektorcaspasen und aktivieren Apoptose.

Der intrinsische Apoptoseweg: Zellulärer Stress aktiviert Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie und führt zur Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium. Cytochrom c formt zusammen mit Apaf-1 und Procaspase 9 das Apoptosom. Die mit der Formation dieses Komplexes einhergehende Konformationsänderung resultiert in der autokatalytischen Aktivierung der Caspase 9. In der Folge spaltet Caspase 9 die Effektorcaspasen und Apoptose wird initiiert.

Die intrinsische Apoptose kann auch über Caspase-8-Aktivierung ausgelöst werden. Hierbei wird das Protein Bid zu tBid prozessiert, welches in dieser aktivierten Form die intrinsische Apoptose induziert.

Die intrinsische Apoptose wird im Gegensatz zur extrinsischen Apoptose durch intrinsische Signale ausgelöst (*Abbildung 1*). Zahlreiche Stressstimuli, wie virale Infektionen, DNA-Schäden, Wachstumsfaktorentzug, Onkogenaktivierung, oxidativer Stress oder UV-Strahlung aktivieren die intrinsische Apoptose [10, 11]. Diese Signale führen zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und zur Freisetzung apoptogener Faktoren wie Cytochrom c (Cyt c), Smac/Diablo oder Omi aus dem mitochondrialen Intermembranraum. Im Zytosol bindet Cyt c an Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) und induziert die Bildung des sogenannten Apoptosoms, an dem Procaspase 9 aktiviert wird. Durch die Bindung von Cyt c an monomeres Apaf-1 wird dessen Konformation geändert und mit weiteren Cyt c-Apaf-1-Molekülen werden heptamere Komplexe gebildet. Diese Oligomerisierung rekrutiert Procaspase 9 an das Apoptosom, was zur autokatalytischen Spaltung der Caspase 9 führt [12, 13]. Im Gegensatz zur Initiatorcaspase 8 bleibt die aktive Caspase 9 am Apoptosom gebunden und nur diese zeigt volle katalytische Aktivität [14]. Die ebenfalls aus dem mitochondrialen Intermembranraum freigesetzten Faktoren Smac/Diablo und Omi hemmen die *Inhibitor of Apoptosis Proteins* (IAPs), um die volle Aktivierung der Caspasenkaskade zu gewährleisten [8].

Neben den erwähnten Stressstimuli kann die intrinsische Apoptose auch über die Caspase-8-Aktivierung ausgelöst werden. Es existieren einige Zelltypen, in welchen die DISC-Bildung stark vermindert ist und deshalb nur geringe Mengen an Caspase 8 aktiviert werden. Um die Elimination der Zelle zu gewährleisten, wird in diesem Fall das Protein Bid durch die Caspase 8 zu tBid prozessiert, welches in dieser aktivierten Form die intrinsische Apoptose triggert [10].

1.1.1.2. Regulation der intrinsischen Apoptose durch die Bcl-2-Proteinfamilie

Ein wichtiges Regulativ des intrinsischen Apoptoseweges stellt die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran dar, denn sobald apoptogene Faktoren aus dem mitochondrialen Intermembranraum freigesetzt sind, wird die Caspasenkaskade aktiviert und die Apoptose vollzogen. Die Integrität der Mitochondrienmembran wird durch die Bcl-2-Proteinfamilie reguliert. Anlehnend an die wichtige Funktion dieser Bestandteile wird der intrinsische Apoptoseweg auch als mitochondriale oder Bcl-2 regulierte Apoptose bezeichnet.

Das *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) Protein wurde erstmals im Jahr 1985 von Croce als Gen beschrieben, welches aufgrund einer chromosomalen Translokation in B-Zell-Lymphomen überexprimiert wird [15]. Seit der Entdeckung des Bcl-2-Gens sind heute eine Vielzahl an Struktur und Funktionshomologen bekannt, die zusammengefasst als Bcl-2-Proteinfamilie bezeichnet werden. Charakteristisch für die Bcl-2-Proteinfamilie ist das Auftreten von bis zu vier Domänen hoher Sequenzhomologie, den Bcl-2-Homologie-Domänen (BH1-BH4). Diese konservierten Bereiche spielen bei der Funktion der Bcl-2-Proteine eine wichtige Rolle. Die BH1-BH3-Domänen sind für die Ausbildung einer hydrophoben Tasche notwendig, welche durch die N-terminale BH4-Domäne stabilisiert werden kann [16]. Diese Struktur ist Voraussetzung für die Interaktion und Ausbildung von Homo- und Heterodimeren unter den

Bcl-2-Proteinen [17]. Anhand der BH-Domänen und der Funktion können die Bcl-2-Proteine in drei Gruppen untergliedert werden (*Abbildung 2*).

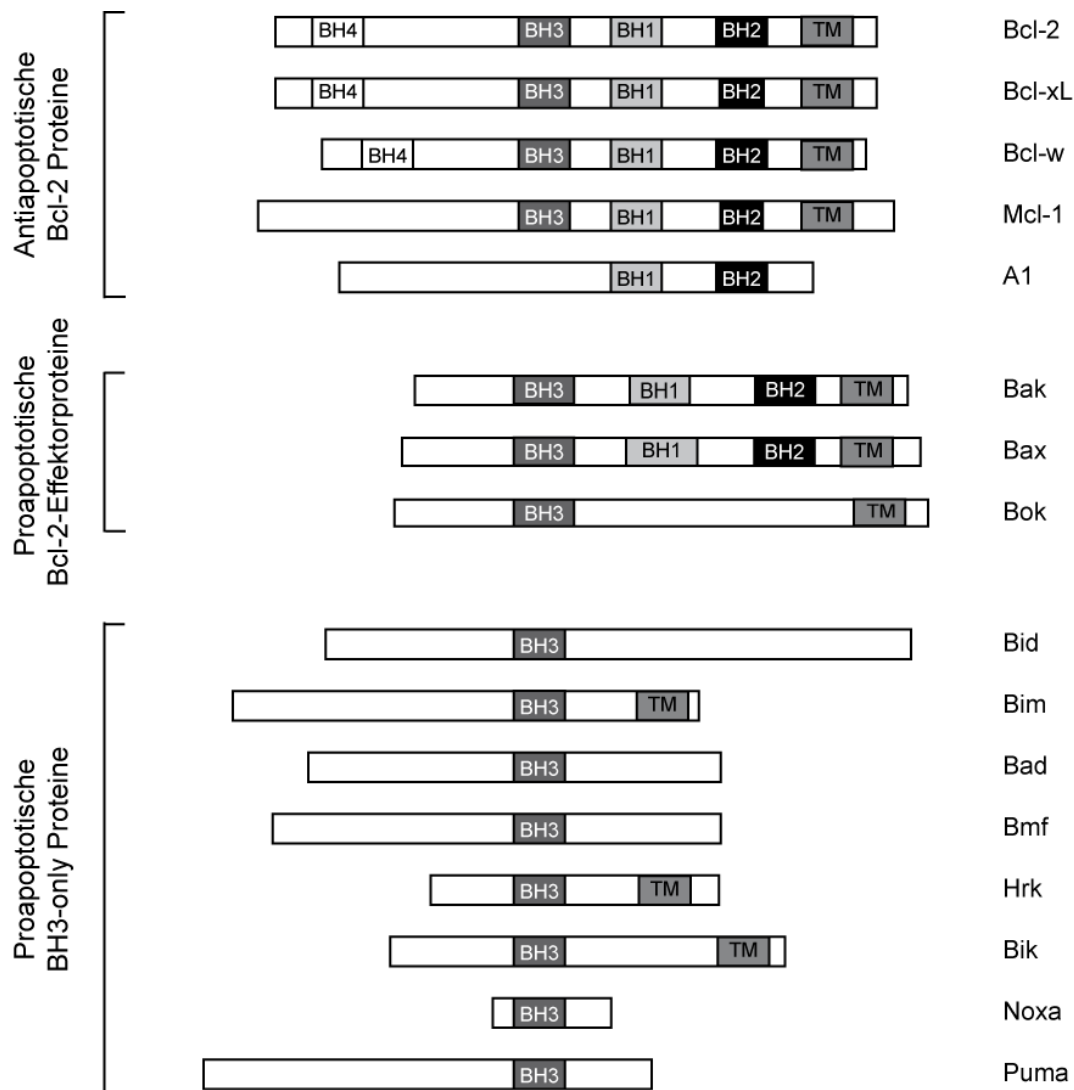


Abbildung 2: Die Bcl-2-Proteinfamilie

Die Bcl-2-Proteine werden anhand der Anzahl ihrer Bcl-2-Homologie (BH)-Domänen und ihrer Funktion in drei Gruppen untergliedert: Die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1) besitzen bis zu vier BH-Domänen (BH1 - 4) und weisen eine Transmembrandomäne (TM) auf. Die proapoptotischen Bcl-2-Effektorproteine (Bax, Bak, Bok) weisen bis zu drei BH-Domänen (BH1–3) und eine Transmembrandomäne (TM) auf. Die proapoptotischen BH3-only-Proteine (Bid, Bim, Bad, Bmf, Hrk, Bik, Noxa, Puma) besitzen nur eine BH-Domäne, nämlich die BH3-Domäne und weisen gegebenenfalls auch eine Transmembrandomäne (TM) auf.

Abbildung modifiziert nach Youle et al., 2008.

Die erste Untergruppe besteht aus den **antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen**. Zu ihnen zählen Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 und A1. Die Proteine Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w weisen alle vier BH-Domänen auf, während Mcl-1 die BH4- und A1 die BH3- und BH4-Domäne fehlt. Zusätzlich besitzen die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine mit Ausnahme von A1 eine Transmembrandomäne (TM), welche die Verankerung in der Mitochondrienmembran aber auch in der Kernmembran oder im Endoplasmatischen Retikulum ermöglicht [18]. Die

antiapoptotischen Proteine sind frei oder gebunden an andere Bcl-2-Proteine im Zytosol oder in der Mitochondrienmembran verankert.

Eine weitere Untergruppe stellen die **proapoptotischen Bcl-2-Effektorproteine** dar. Als erstes Mitglied dieser Gruppe wurde Bax identifiziert, ein Protein, das die antiapoptotische Funktion von Bcl-2 hemmt [19]. Seither sind zwei weitere Homologe identifiziert worden, Bak und Bok, wobei letzteres am wenigsten untersucht ist. Bax und Bak weisen wie auch die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine die BH1-BH3-Domänen sowie eine N-terminale Transmembrandomäne auf. Dadurch können sie mit anderen Bcl-2-Homologen interagieren und mit der Mitochondrienmembran in Wechselwirkung treten [20-22]. In unstimulierten Zellen liegt Bax im Zytosol vor und wird durch apoptotische Stimuli an das Mitochondrium rekrutiert. Bak hingegen ist auch in gesunden Zellen bereits in der äußeren Mitochondrienmembran verankert. Die Aktivierung der Bcl-2-Effektorproteine während der Apoptose beinhaltet verschiedene Konformationsänderungen und führt zur Homo-Oligomerisierung von Bak und Bax an der äußeren Mitochondrienmembran. Dieser Prozess geht mit der Permeabilisierung der Mitochondrienmembran und der Freisetzung von Cytochrom c einher (*Abbildung 1*). Der genaue Mechanismus, wie die proapoptotischen Effektorproteine die Membranintegrität beeinflussen, ist noch unklar. Weitgehend akzeptiert ist, dass die Effektormoleküle Bax und Bak essentiell für die Induktion der Apoptose sind, da die mitochondriale Apoptose in Bax/Bak Doppel-Knockout Zellen nicht mehr induziert werden kann. Es wird angenommen, dass oligomerisiertes Bax und Bak in der äußeren Mitochondrienmembran Poren bilden, und so die apoptogenen Faktoren aus dem Intermembranraum freigesetzt werden können [11].

Die dritte Untergruppe der Bcl-2-Familie sind die **proapoptotischen BH3-only-Proteine**. Der Name beschreibt bereits ihr gemeinsames Merkmal, sie weisen alle nur die BH3-Domäne auf. Strukturanalysen haben gezeigt, dass die BH3-only-Proteine über ihre BH3-Domäne mit der hydrophoben Tasche der antiapoptotischen sowie der proapoptotischen Bcl-2-Effektorproteinen interagieren und auf diesem Weg die Apoptose induzieren können [21, 22]. In der gesunden Zelle besteht ein Gleichgewicht aus antiapoptotischen und proapoptotischen Proteinen. Erst die Aktivierung oder transkriptionelle Induktion proapoptotischer BH3-only-Proteine verschiebt das Gleichgewicht zwischen apoptosefördernden und apoptosehemmenden Faktoren, so dass der Zelltod vollzogen werden kann. Abhängig vom Apoptosesignal werden entweder ein oder mehrere BH3-only-Proteine aktiviert.

Die Regulation der Aktivität der BH3-only-Proteine erfolgt auf mehreren Ebenen. Sie können posttranskriptionell reguliert werden, beispielsweise durch Phosphorylierung (Bad, Bim), durch die Integrität im Zytoskelett (Bim), durch proteolytische Spaltung (Bid) oder durch eine veränderbare proteosomale Degradation (Bim, tBid). Ein weiterer Regulationsmechanismus ist die transkriptionelle Induktion, besonders Noxa und Puma werden auf diesem Weg reguliert, aber auch die Expression von Bim, Bid und Hrk kann durch apoptotische Stimuli gesteigert werden [23, 24]. Die Aufgabe der BH3-only-Proteine ist es, apoptotische Signale an die Effektoren weiter zu leiten. Wie genau die proapoptotischen BH3-only-Proteine zur Aktivierung von Bax und Bak führen, ist jedoch noch umstritten. Durch die Forschungen in

den letzten Jahren wurden zwei Modelle aufgestellt, wie BH3-only-Proteine die Apoptose induzieren, das „direkte“ und das „indirekte“ Modell der Aktivierung (*Abbildung 3*).

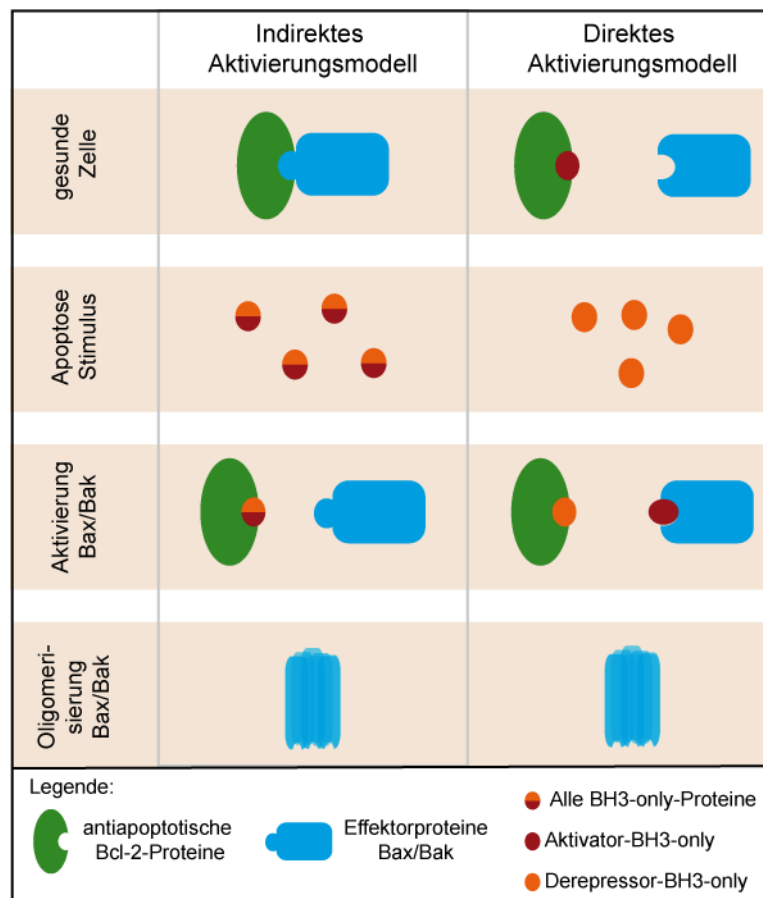


Abbildung 3: Modelle der Bax/Bak-Aktivierung

Das indirekte Aktivierungsmodell: In der gesunden Zelle inhibieren die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine die Bcl-2-Effektorproteine Bax und Bak durch eine Interaktion. Apoptotische Stimuli aktivieren BH3-only-Proteine, welche an die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine binden und so die Effektorproteine aus ihrer inhibitorischen Bindung lösen. Freies Bax und Bak homooligomerisieren an der äußeren Mitochondrienmembran und induzieren die Freisetzung von Cytochrom c.

Das direkte Aktivierungsmodell: Antiapoptotische Bcl-2-Proteine binden die proapoptotischen Aktivator-BH3-only-Proteine. Bax und Bak liegen frei vor. Apoptotische Stimuli aktivieren Derepressor-BH3-only-Proteine, welche die Aktivator-BH3-only-Proteine aus ihrer Bindung an die antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen befreien. Freie Aktivator-BH3-only-Proteine können direkt an Bax und Bak binden und so die Homooligomerisierung der Bcl-2-Effektorproteine induzieren und Apoptose auslösen.

Abbildung modifiziert nach Danial et al., 2007.

Das indirekte Aktivierungsmodell: In diesem Modell wird davon ausgegangen, dass Bax und Bak in gesunden Zellen durch antiapoptotische Proteine gebunden und dadurch inaktiviert sind. Apoptotische Stimuli führen zur Aktivierung von BH3-only-Proteinen, welche wiederum über die BH3-Domäne mit den antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen interagieren. Durch diese Interaktion verdrängen die BH3-only-Proteine die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine aus ihrer Bindung an Bax und Bak, wodurch die Bcl-2-Effektorproteine freigesetzt werden. Die Freisetzung von Bax und Bak führt zur Konformationsänderung und Oligomerisierung an der Mitochondrienmembran, eine weitere Aktivierung von Bax und Bak ist in diesem Modell nicht notwendig. Es hat sich gezeigt, dass die BH3-only-Proteine Bim,

tBid und Puma eine stärkere apoptoseauslösende Wirkung besitzen als die restlichen BH3-only-Proteine. Diese Tatsache wird in diesem Modell durch die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der BH3-only-Proteine zu den antiapoptotischen Proteinen erklärt (Abbildung 4). Für die Induktion der Apoptose müssen mehrere antiapoptotische Bcl-2-Proteine neutralisiert werden. Das starke apoptotische Potential von Bim, tBid und Puma wird dadurch erklärt, dass sie in der Lage sind, alle antiapoptotischen Bcl-2 Proteine zu binden und somit zu neutralisieren. Hingegen können die restlichen nur mit bestimmten antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen interagieren. Das schwache apoptotische Potential von Noxa oder Bad wird also durch ihre selektive Bindungsaffinität erklärt. Noxa neutralisiert nur Mcl-1 und A1, Bad kann mit Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w interagieren. Die alleinige Aktivierung von Noxa oder Bad führt nicht zur Zelltodinduktion, während ihre Ko-Aktivierung effizient die Oligomerisierung von Bax und Bak induziert [16, 23, 25].

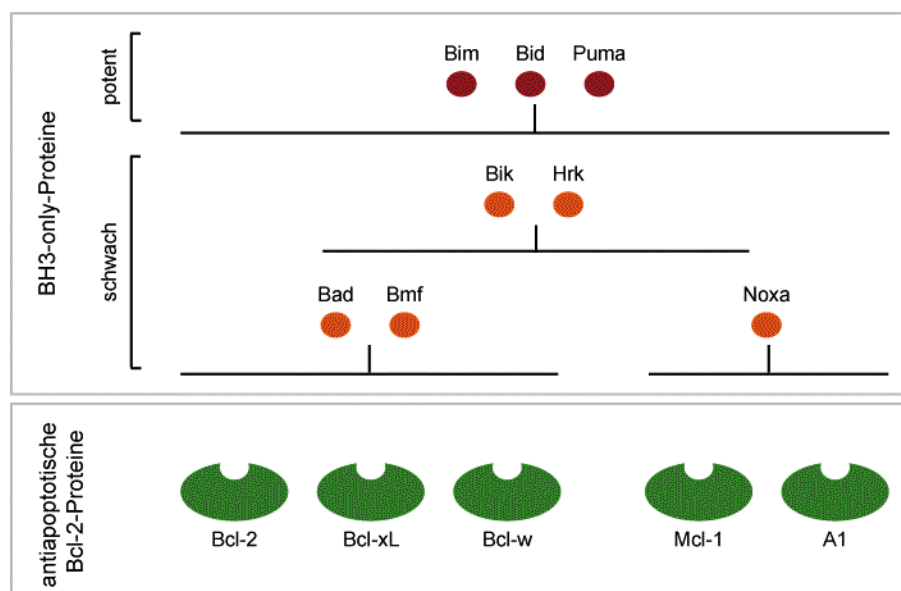


Abbildung 4: Unterschiedliche Bindungsaffinitäten der BH3-only-Proteine

Die proapoptotischen BH3-only-Proteine können über ihre BH3-Domäne an die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine binden. Einige BH3-only-Proteine (Bid, Bim, Puma) können alle antiapoptotischen Bcl-2-Proteine binden und gelten als potente Apoptose-Induktoren. Hingegen binden andere BH3-only-Proteine nur spezifische antiapoptotische Bcl-2-Proteine. Zum Beispiel interagiert Bad vorwiegend mit Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w aber nicht mit Mcl-1 oder A1. Hingegen zeigt Noxa hohe Bindungsaffinitäten zu Mcl-1 und A1, aber nicht zu den restlichen antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen. Durch die selektive Bindungsaffinität wird deren schwaches apoptotisches Potential erklärt.

Abbildung modifiziert nach Willis et al., 2005.

Das direkte Aktivierungsmodell: Dieses Modell der Bax- und Bak-Aktivierung beruht auf der Beobachtung, dass Bim, tBid und Puma, nicht aber die restlichen BH3-only-Proteine die Oligomerisierung von Bax und Bak induzieren können [26-29]. Diese drei Proteine werden als „Aktivator“-BH3-only-Proteine bezeichnet, da sie an Bax und Bak binden und diese direkt aktivieren können. Die restlichen BH3-only-Proteine besitzen selbst nicht das Potential Apoptose zu induzieren, wirken aber bei der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran synergistisch und werden als „Derepressor“-BH3-only-Proteine bezeichnet. In dem Modell wird davon ausgegangen, dass die Aktivator-

BH3-only-Proteine in gesunden Zellen von den antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen gebunden und somit inaktiv sind. Durch apoptotische Signale werden die Derepressor-BH3-only-Proteine aktiviert und konkurrieren mit den Aktivatoren um die Bindung an die antiapoptotischen Proteine. Sind ausreichend Derepressoren aktiviert, werden die Aktivatoren aus der Bindung an antiapoptotische Bcl-2-Proteine verdrängt und können dann an freies Bax und Bak binden. Durch diese Interaktion wird die Konformation von Bax und Bak geändert und die Oligomerisierung der Bcl-2-Effektorproteine an der äußeren Mitochondrienmembran wird induziert [16, 23, 25].

1.1.2. Die Rolle der Apoptose in der Tumorgenese und Tumorthherapie

Klassische Apoptose-Stimuli stellen beispielsweise DNA-Schäden, virale Infektionen, Wachstumsfaktorentzug oder Hypoxie dar. Auch die Aktivierung spezieller proliferationsfördernder Onkogene führt zur Induktion des Zelltodes. Beispielsweise kann der Zelltod durch die Überexpression des Onkogens MYC ausgelöst werden. Die Deregulation des Onkogens führt zur Aktivierung des Tumor-Suppressors p19^{ARF}, welcher wiederum p53 triggert. Die Aktivierung von p53 erhöht die Expression der proapoptotischen BH3-only-Proteine Noxa und Puma, wodurch mitochondriale Apoptose ausgelöst wird [30-32].

Tumorzellen weisen im Gegensatz zu einer gesunden Zelle eine Vielzahl von Abnormalitäten auf, wie genomische Instabilität, das Vorhandensein proliferationsfördernder Onkogene oder Wachstum in einem nähr- und sauerstoffarmen Milieu – ohne dass die Apoptose in diesen Zellen induziert wird. Tumorzellen haben also die Fähigkeit entwickelt, dem „Selbstmordprogramm“ entgegen zu wirken. Die Entdeckung des Bcl-2-Gens führte zu dem Verständnis, dass Tumorzellen durch die Expression spezifischer antiapoptotischer Proteine in der Lage sind, Apoptose zu umgehen [33]. Die Bcl-2-Expression ist in 85% aller folliculären B-Zell Lymphome durch chromosomale Translokation in der J-Region der schweren Immunoglobulinkette erhöht. Untersuchungen zu dem transformierenden Potential des Bcl-2-Gens zeigten, dass Bcl-2 die Formation von B-Zell-Lymphomen fördert, wenn es zusammen mit dem MYC-Onkogen in transgenen Mäusen exprimiert wird. Dieser Mechanismus basiert nicht auf einer weiteren Förderung des MYC-vermittelten Wachstums, sondern sichert das Überleben der Lymphozyten durch die Hemmung der Apoptose [34]. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Apoptose durch proliferationsfördernde Onkogene induziert werden kann, und es für die Tumorbildung von großer Bedeutung ist, apoptotische Signalwege zu blockieren. Durch diese Studien wurde eine bis dahin unbekannte Art von Onkogenen definiert, die im Gegensatz zu proliferationsfördernden Onkogenen die Apoptose hemmen.

Betrachtet man die Regulation der mitochondrialen Apoptose, kann die Umgehung der Zelltodinduktion theoretisch durch drei unterschiedliche Mechanismen erzielt werden [35]. Zum einen durch die Herabsetzung des Aktivierungspotentials proapoptotischer BH3-only-Proteine. Dies kann beispielsweise durch einen kompletten Verlust der Proteine oder durch Modulationen in den übergeordneten Signalwegen, welche die Aktivierung der BH3-only-Proteine steuern (zum Beispiel durch p53-Inaktivierung), stattfinden. Weiterhin kann die

Ausschaltung des Effektorarms des Signalweges, durch Mutationen in den Bax- und Bak-Genen, eine Resistenz gegenüber apoptotischen Signalen vermitteln. Schließlich kann die Apoptose durch eine erhöhte Expression antiapoptotischer Bcl-2-Proteine umgangen werden, wie durch die Überexpression von Bcl-2 in B-Zell-Lymphomen. Sämtliche Veränderungen in der Apoptoseregulation können einzeln oder in Kombination zur Tumorentstehung beitragen.

Eine weitere Konsequenz der Fehlregulation apoptotischer Signalwege ist die Resistenz der Tumorzelle gegenüber therapeutischen Verfahren. Die meisten Therapieverfahren, wie die Strahlen- oder Chemotherapie entfalten ihre Wirkung über die Induktion von Apoptose [36]. Sind die betroffenen Signalwege dereguliert, weisen die Zellen eine Resistenz gegenüber der Behandlung auf. Neue Therapieansätze haben das Ziel, diese Hürden zu überwinden. Durch das gezielte Eingreifen in apoptotische Signalwege sollen resistente Zellen für die Therapie zugänglich gemacht werden. Unterschiede in der Apoptoseregulation zwischen malignem und nicht-malignem Gewebe können als Angriffspunkte für neue therapeutische Strategien genutzt werden, um spezifisch Apoptose in Tumorzellen zu aktivieren. In dieser Arbeit wird unter anderem die Apoptoseregulation in nicht-malignen Zellen der Haut sowie in malignen Melanomzellen untersucht, um neue Ansätze für die Therapie des malignen Melanoms aufzudecken.

1.2. Das maligne Melanom

Das maligne Melanom (schwarzer Hautkrebs) ist ein hochgradig maligner Tumor, dessen Ursache in der Entartung von Melanozyten, den pigmentbildenden Zellen der Haut liegt. Melanome können sich spontan auf unauffälliger Haut bilden oder aus den benignen Vorstufen, den melanozytären Nävi entstehen. Seltener finden sich Melanome auch auf den Schleimhäuten oder im Auge. Unter den bösartigen Neubildungen in Deutschland hat das Melanom einen Anteil von 3%, verursacht aber etwa 1% aller Krebstodesfälle [37]. Die Häufigkeit der Diagnose malignes Melanom steigt in der hellhäutigen Bevölkerung stark an. Zu den wichtigsten Risikofaktoren zählt die genetische Vorbelastung, 5-10% aller Melanome treten in Familien auf, in welchen bereits früher Melanome aufgetreten sind [38, 39]. Weitere Risikofaktoren sind unter anderem das Vorhandensein von vielen benignen oder atypischen Nävi, Immunsuppression und eine hohe UV-Belastung. Durch letztere kann die hohe Erkrankungsrate in Australien (50-60 Personen/ 100.000 Einwohner) verglichen mit 10-14 Personen/ 100.000 Einwohnern in Zentraleuropa erklärt werden [40, 41].

In frühen Stadien sind Melanome mit einer guten Prognose assoziiert (10-Jahres Überlebensrate beträgt bis zu 95%), da eine vollständige chirurgische Entfernung des Tumors in diesen Fällen noch sehr wahrscheinlich ist. Da jedoch das Melanom schon bei geringer Tumorgroße zur Metastasierung neigt und der Tumor eine hohe Resistenz gegenüber gängigen Chemotherapeutika aufweist, sind fortgeschrittene Melanome noch immer mit einer sehr schlechten Prognose assoziiert [42, 43]. Mit eingetretener

Fernmetastasierung sinkt die 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit auf 3%. Dies verdeutlicht, dass die Entwicklung neuer Therapieansätze unbedingt notwendig ist.

1.2.1. Molekulare Grundlagen der Melanomentstehung

Clark beschrieb 1984 die histologischen Veränderungen während der Melanomentstehung, die einem 5-Stufen-Modell der Melanomprogression entsprechen (*Abbildung 5*) [44].

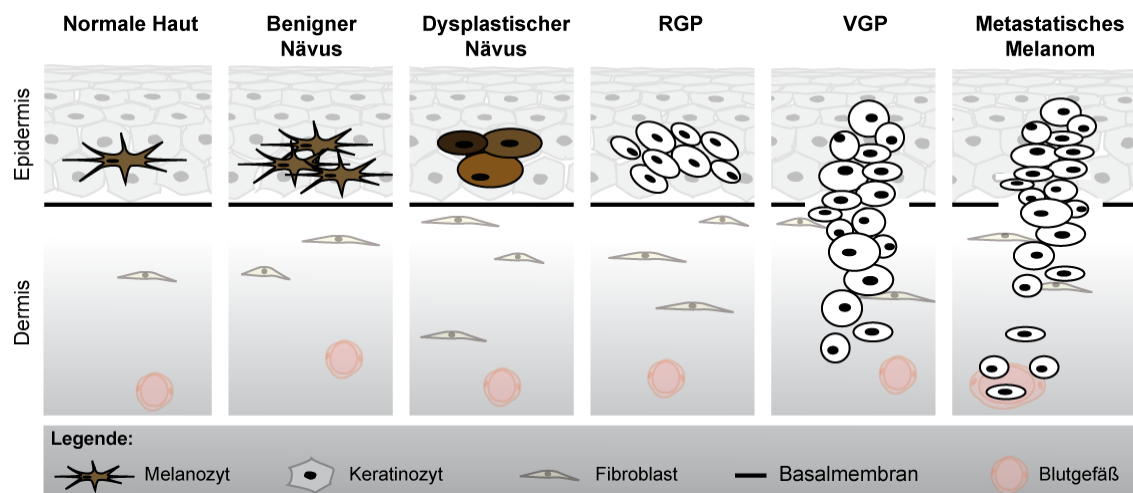


Abbildung 5: Modell der Melanomprogression nach Clark

Während der Melanomprogression können histologische Veränderungen beobachtet werden. Gutartige Läsionen (benigne Nävi) zeichnen sich durch eine Vermehrung von morphologisch veränderten Melanozyten aus. Diese können sich weiter entwickeln zu dysplastischen Nävi, aus denen sich Melanome bilden können. In der „radiären“, also horizontalen Wachstumsphase (RGP) breitet sich der Tumor flächig aus und zeigt ein geringes invasives Potential. Durchdringen die Tumorzellen die Basalmembran und wachsen in die Dermis ein, spricht man von der vertikalen Wachstumsphase (VGP). Ein Abwandern einzelner Tumorzellen vom Primärtumor mit Ausbreitung über Lymph- und Blutgefäße führt zur Bildung von Tochtergeschwülsten in entfernten Geweben und Organen.

Abbildung modifiziert nach Miller et al., 2006.

Ausgangspunkt stellen Melanozyten dar, die sich in der Basalzellschicht der Epidermis befinden und umgebende Keratinozyten mit Melanin versorgen. Veränderungen der Melanozyten können zur vermehrten Proliferation, zu morphologischen Veränderungen und schließlich zur Ausbildung von benignen melanozytären Nävi führen. Die nächste Stufe der Tumorprogression stellt ein dysplastischer Nävus dar, der sich durch atypische Nävuszellen auszeichnet. Weitere Veränderungen führen zu einer intraepidermalen Ausbreitung von Zellen mit malignem Phänotyp. In dieser radialen/horizontalen Wachstumsphase (*radial growth phase*, RGP) breitet sich der frühe Tumor flächig aus, hat aber nur ein geringes invasives Potential. In der nächsten, vertikalen Wachstumsphase (*vertical growth phase*, VGP) hat der Tumor die Basalmembran durchbrochen und ist in die Dermis eingewandert. Schließlich breiten sich die Zellen über die Lymph- und Blutgefäße aus und bilden Tochtergeschwülste in entfernten Geweben und Organen [44, 45].

Diese histologischen Veränderungen werden durch die Akkumulation (epi-)genetischer Veränderungen verursacht. Die Transformation von Melanozyten zu metastatischen

Melanomzellen ist ein sehr komplexer Prozess. Einige genetische Veränderungen, die zum Erwerb der von Hanahan und Weinberg postulierten Eigenschaften von Krebs führen, sind für das Melanom beschrieben und im Folgenden aufgeführt [41, 46].

Eine gesteigerte Proliferation ist typisch für die frühen Stadien der Tumorentstehung. Zum ersten Proliferationsschub im Melanom führen oft aktivierende Mutationen von Proteinen des Ras-Raf-MAP-Kinase-Signalwegs. Mutationen in den N-Ras- oder B-Raf-Kinasen können in zirka 70-80% aller melanozytärer Nävi und Melanome nachgewiesen werden [47]. Durch die dauerhafte Aktivierung dieses Signalweges werden aber auch Faktoren stimuliert, die einer Zellteilung entgegenwirken, wodurch die Proliferation dauerhaft gestoppt wird und die Zellen in einen Ruhezustand treten, der als zelluläre Seneszenz bezeichnet wird [48]. Die Seneszenz kann durch die Akkumulation weiterer genetischer Veränderungen aufgehoben werden, beispielsweise durch den Verlust des CDKN2A-Genlokus. Dieses Gen kodiert für zwei zellzyklushemmende Faktoren, p16^{INK4A} und p19^{ARF}. Mutationen in diesem Genabschnitt sind vor allem in familiären aber auch in nicht familiären Melanomen zu finden [49]. Der Verlust dieses Gens begünstigt einen Übergang von der G₀- in die G₁-Phase des Zellzyklus, wodurch die durch die B-Raf-Mutation angeregte Proliferation der Zellen nicht gestoppt werden kann.

Einen weiteren Signalweg, der im malignen Melanom auch in früheren Tumorstadien häufig dereguliert ist, stellt der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-Proteinkinase B (AKT)-Signalweg dar. Durch Wachstumsfaktoren wird die PI3-Kinase aktiviert, welche über die Phosphorylierung von Botenstoffen die Aktivierung der Kinase AKT triggert. Zu den Substraten von AKT zählen vor allem Regulatoren des Zellzyklus und der Apoptose, wodurch die Proliferation und das Überleben der Zellen gefördert werden [50]. Die Phosphatase PTEN ist ein negativer Regulator dieses Signalweges. Durch die PTEN-Aktivität wird der Botenstoff dephosphoryliert und somit die AKT-Aktivität gesenkt, wodurch Zellzyklusarrest und Apoptose gefördert wird [51]. Der PI3K-Signalweg ist in etwa 50-60% aller Melanome entweder durch eine Überexpression von AKT selbst oder durch einen PTEN-Verlust verstärkt aktiv [52]. Daraus resultiert aufgrund der reduzierten Fähigkeit zum Zellzyklusarrest und zur Apoptose ein klarer Überlebensvorteil gegenüber normalen, nicht veränderten Zellen.

Neben AKT sind weitere Faktoren beschrieben, die im Melanom zu einer verminderten Apoptose führen können. Zum Beispiel ist eine reduzierte Expression von APAF-1 beschrieben, einem Bestandteil des Apoptosoms, das für die Caspasen-Aktivierung notwendig ist [53]. Auch die erhöhte Expression antiapoptotischer Bcl-2-Proteine stellt im Melanom einen Mechanismus dar, Apoptose zu umgehen [54, 55].

Zu den weiteren Veränderungen, die beim Melanom beobachtet wurden, gehören eine erhöhte Telomerase (TERT)-Aktivität. Sie verhindert die Kürzung der Telomere nach jeder S-Phase, wodurch den Tumorzellen ein gesteigertes Proliferationspotential ermöglicht wird [56, 57]. Außerdem wurde eine erhöhte Pleiotrophin (PTN)-Expression im Melanom beschrieben. PTN fördert die Angiogenese und ermöglicht somit die Nähr- und Sauerstoffversorgung des wachsenden Tumors. PTN regt einerseits die Freisetzung von proteolytischen Enzymen aus Endothelzellen an und fördert andererseits die Ausbildung tubulärer Strukturen [58].

Den letzten Schritt der Tumorprogression stellt die Invasion und Metastasierung der Tumorzellen dar. Melanomzellen müssen also noch weitere Fähigkeiten erwerben, um in fremdes Gewebe einzuwandern und in der Peripherie zu proliferieren. Diese Eigenschaften sind den Eigenschaften der Vorläuferzellen der Melanozyten, den Neuralleistenzellen, sehr ähnlich. Diese können während der Embryogenese ebenfalls ihren primären Ursprungsort verlassen, in die Peripherie wandern und dort proliferieren. In den Neuralleistenzellen werden diese Vorgänge durch neuronale Transkriptionsfaktoren wie Snail, Slug, Sox 9 und Sox 10 gesteuert. Diese Faktoren sind in malignen Melanomzellen häufig re-exprimiert und an der Migration, Invasion und Metastasierung beteiligt [59].

Die Invasion der Melanomzellen von der Epidermis in die Dermis wird durch die gesteigerte Expression von Metalloproteinasen gefördert, welche die Basalmembran zerstören und enzymatisch das Gewebe aufschließen [60]. Weiterhin wird das Eindringen in die Dermis durch ein verändertes Expressionsmuster von Zelladhäsionsmolekülen ermöglicht. Im Laufe der Tumorprogression exprimieren Melanomzellen weniger E-Cadherin, aber mehr N-Cadherin. Dadurch lösen sich die Tumorzellen von den E-Cadherin exprimierenden Keratinozyten der Epidermis und interagieren mit den Fibroblasten und Endothelzellen in der Dermis [61].

1.2.2. Therapie des malignen Melanoms

1.2.2.1. Klassische Therapieansätze

Die Therapie des malignen Melanoms stellt nach wie vor eine große Herausforderung dar. Eine Heilung wird nur bei rechtzeitig erkannten Tumoren ohne Anzeichen einer bereits eingetretenen Metastasierung durch eine operative Therapie erzielt. Die 10-Jahres-Überlebensrate liegt hier bei 70-97% [62]. Therapeutische Probleme treten bei eingetretener Fernmetastasierung auf, denn eine kurative Therapie in fortgeschrittenen Stadien existiert nicht. Bei Patienten mit hohem Risiko einer Metastasierung kann eine adjuvante Therapie durchgeführt werden, um der Bildung von Tochtergeschwülsten vorzubeugen. In Deutschland ist die Therapie mit Interferon- α (IFN- α) als adjuvante Therapie des Melanoms zugelassen. Klinische Studien haben gezeigt, dass die Behandlung mit IFN- α mit einer signifikanten Verlängerung des rezidivfreien Überlebens und zum Teil auch des Gesamtüberlebens einhergeht [63].

In fortgeschrittenen Stadien mit bereits eingetretener Fernmetastasierung sinken die Überlebensraten drastisch ab. Bei chirurgischer Entfernung der Tochtergeschwülste besteht noch eine 5-Jahres-Überlebensrate von 20%. Ist jedoch eine komplette Entfernung der Metastasen nicht möglich, so ist die durchschnittliche Lebenserwartung deutlich weniger als ein Jahr [64]. Beim Vorliegen von Fernmetastasen können Patienten nur unter palliativen Gesichtspunkten behandelt werden. Wegen der geringen Toxizität wird als Standard eine Monochemotherapie mit dem seit über 30 Jahren zugelassene Dacarbazin (DTIC) eingesetzt. Nur 10-20% der Patienten sprechen auf DTIC an, wobei komplette Remissionen

sehr selten sind und die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei lediglich 2% liegt. Auch Paclitaxel, Vindesin, Temozolomid und Fotemustin können zur Monochemotherapie angewendet werden. Alternativ werden kombinierte Ansätze, also Polychemotherapien oder Chemoimmunotherapien (mit IL-2, IFN- α) durchgeführt. Eine signifikante Steigerung der Überlebensrate konnte jedoch dadurch nicht nachgewiesen werden. Deshalb ist vor allem bei den Kombinationstherapien, die in der Regel eine höhere Toxizität aufweisen als die Monotherapien, die Lebensqualität des Patienten zu berücksichtigen.

1.2.2.2. Neue Therapiekonzepte

Die Entdeckung von genetischen Veränderungen, die an der Entstehung des malignen Melanoms beteiligt sind, hat zur Entwicklung neuer Therapieansätze geführt. Ein wichtiger Fortschritt wurde im letzten Jahr mit einem B-Raf-Inhibitor erreicht. Die B-Raf-Kinase ist in 50-60% aller Melanome mutiert und fördert über die konstitutive Aktivierung des MAPK-Signalweges die Tumorprogression. Ein spezifischer Inhibitor, der speziell die mutierte Form von B-Raf hemmt, zeigte in einer Phase-I-Studie eine erstaunliche therapeutische Wirksamkeit. Von 32 Patienten im fortgeschrittenen Tumorstadium, welche die B-Raf-Mutation aufweisen, wurde in 24 Patienten eine partielle und in 2 Fällen sogar eine vollständige Remission beobachtet [65]. Jedoch ist einschränkend zu erwähnen, dass bei der Hälfte der Patienten innerhalb der ersten sechs Monate eine Resistenz gegen die Therapie eintrat. Demnach wurde durch die B-Raf-Inhibitoren für ein bestimmtes Patientenkollektiv zwar ein effektiver neuer therapeutischer Ansatz geschaffen, doch bleibt nach wie vor die Resistenz gegenüber der Therapie zu überwinden [66, 67].

Ein weiterer neuer Ansatz ist die Inhibition der Rezeptor-Tyrosinkinase c-Kit. C-Kit-Mutationen werden in speziellen Melanom-Untergruppen beobachtet und c-Kit-Inhibitoren wie Imatinib zeigen in diesen Fällen Wirksamkeit [68, 69].

Die neuen Ansätze, die als „*targeted therapy*“ bezeichnet werden, greifen gezielt in die Signalwege ein, die an der Pathogenese des Tumors beteiligt sind, und deuten darauf hin, dass ein tumorspezifisches Angreifen möglich ist.

1.3. Strategien zur Überwindung der Apoptoseresistenz

In den letzten Jahren wurden Veränderungen im Ablauf apoptoseregulierender Signalkaskaden entdeckt, die einerseits zur Tumorentstehung beitragen und andererseits eine Resistenz gegenüber der Apoptose-induzierenden Chemotherapie vermitteln [70]. Ein möglicher Ansatz, diese Resistenz zu überwinden, ist die Anwendung der kombinierten Chemotherapie. Die verschiedenen eingesetzten Zytostatika wirken über unterschiedliche Mechanismen. Sie können die DNA-Replikation oder die Mitose hemmen, aber auch Schäden im Zytoskelett oder der DNA/RNA verursachen. Durch eine geeignete Kombination können apoptotische Signalwege aktiviert werden, die synergistisch wirken, wodurch die Resistenz aufgehoben werden kann. Da Zytostatika jedoch nicht spezifisch auf entartete

Zellen wirken, sondern auch gesundes Gewebe schädigen, ist vor allem die kombinierte Chemotherapie mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden. Ein direktes, zielgerichtetes Eingreifen in die Signalwege, die diese Resistenz vermitteln, könnte die Wirkung einer Chemotherapie verbessern und die negativen Begleiterscheinungen minimieren. Neue Therapieansätze zielen darauf ab, resistente Tumorzellen für die Behandlung zu sensibilisieren, während gesundes Gewebe nicht geschädigt wird.

Als interessante Zielgene für die Überwindung der Apoptoseresistenz in Tumorzellen erwiesen sich die Bcl-2-Proteine. Fehlregulationen in den apoptotischen Signalwegen scheinen hauptsächlich oberhalb von Bax und Bak stattzufinden, wobei die apoptotische Maschinerie intakt bleibt und prinzipiell aktivierbar ist.

Ein Konzept, die Apoptoseresistenz in Tumorzellen zu überwinden, ist die Inhibition antiapoptotischer Proteine. Ein Beispiel hierfür stellt ein Antisense-Oligonukleotid (Genasense ®) dar, welches die Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 inhibiert und so Melanomzellen für DTIC sensibilisieren sollte. Eine randomisierte klinische Studie zeigte zwar in einigen klinischen Parametern eine Verbesserung, jedoch konnte das Überleben nicht signifikant verlängert werden. Die Verbesserung der klinischen Parameter war vermutlich nicht auf die verminderte Expression von Bcl-2 zurückzuführen, weil sie mit unspezifischen Effekten der Antisense-Oligonukleotide korrelierte [71, 72].

Neben der direkten Inhibition antiapoptotischer Proteine können komplementär auch die proapoptotischen BH3-only-Proteine überexprimiert, beziehungsweise deren Wirkung imitiert werden. Es können niedermolekulare Wirkstoffe verwendet werden, welche die BH3-Domäne der proapoptotischen Proteine imitieren und durch eine Interaktion die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine neutralisieren. Als Beispiel hierfür kann die chemische Substanz ABT-737 aufgeführt werden. ABT-737 wirkt ähnlich wie die BH3-Domäne von Bad, neutralisiert also Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w [73]. Als Einzelsubstanz zeigt ABT-737 apoptotische Wirkung in einigen Tumorzelllinien und Tumormodellen für Lymphome, Leukämien und kleinzelligen Bronchialkarzinomen. In soliden Tumoren ist die apoptotische Wirkung von ABT-737 allein meist eher gering, allerdings wurde eine Synergie von ABT-737 mit anderen therapeutischen Ansätzen, wie Strahlen- oder Chemotherapie beobachtet [73, 74]. Die Aufklärung apoptotischer Signalwege führte zur Entwicklung neuer Therapiestrategien, jedoch müssen die bestehenden Ansätze noch verbessert werden. Gerade im Melanom bieten sich apoptotische Signalkaskaden als potentielles Ziel therapeutischer Ansätze an, da die Zellen prinzipiell für aktivierende Apoptosesignale zugänglich sind.

1.4. Ziele der Arbeit

Ein charakteristisches Merkmal von Tumorzellen ist nach Hanahan und Weinberg die Resistenz gegenüber Apoptose. Veränderungen in der Regulation apoptotischer Signalwege tragen einerseits zur Tumorentstehung bei und können andererseits das Ansprechen von Tumorzellen auf die Therapie verhindern. Die Bcl-2-Proteinfamilie reguliert den mitochondrialen Apoptoseweg und stellt einen therapeutischen Angriffspunkt dar, in Tumoren die Resistenz gegenüber der Apoptose zu überwinden. Ein weiteres Problem der Tumorthherapie stellt die Spezifität dar, das heißt malignes Gewebe möglichst vollständig zu zerstören, während gesundes Gewebe nicht angegriffen werden soll. Zielsetzung dieser Arbeit ist die Analyse der Expression und Funktion der Bcl-2-Proteine in malignen Melanomzellen und in nicht-malignen Zellen der Haut, um potentielle therapeutische Angriffspunkte zu identifizieren, die eine tumorspezifische Zelltodinduktion ermöglichen. Hierzu wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Die Expression der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine wurde in Melanomzelllinien aus unterschiedlichen Progressionsstufen und vergleichend, in nicht-malignen Zellen der Haut analysiert.
2. Zur Untersuchung der Funktionalität der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine wurden die Proteine mittels RNA-Interferenz in Melanomzelllinien und nicht-malignen Hautzellen gehemmt. Weiterhin wurde der Effekt der Hemmung auf eine mögliche synergistische, tumorspezifische Wirkung zusammen mit chemotherapeutischen Ansätzen untersucht.

Nach der Identifikation geeigneter Proteine als potentielle Angriffspunkte für die Behandlung des Melanoms wurden neue Ansätze hinsichtlich ihrer Eignung als therapeutische Moleküle beim malignen Melanom geprüft. Es wurden virusähnliche RNAs verwendet, und untersucht, ob die Transfektion virusähnlicher RNAs Einfluss auf das Überleben von Melanomzellen zeigt, und ob der mögliche zytotoxische Effekt auf Tumorzellen beschränkt ist. Hierzu wurden folgende Punkte bearbeitet:

3. Um den proapoptotischen, durch virusähnliche RNAs ausgelösten, Signalweg zu charakterisieren, wurde die Beteiligung der Bcl-2-Proteinfamilie an der Apoptoseinduktion evaluiert.
4. Der zugrundeliegende molekulare Mechanismus der tumorspezifischen Zelltodinduktion durch virusähnliche RNAs wurde analysiert.
5. Die transkriptionelle Regulation des proapoptotischen BH3-only-Proteins Noxa wurde untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zellkulturmedien

- Vollmedium

DMEM (4,5 g/L Glukose)	Biochrom	90% (v/v)
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom	10% (v/v)
L-Glutamin (100x)	Gibco	1x

- Medium für Tumorzellen (TU2%)

MCDB153	Sigma	80% (v/v)
Leibovitz L-15	Gibco	20% (v/v)
Fötale Kälberserum	Biochrom	2% (v/v)
Rinderinsulin	Sigma	5 µg/ml
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma	1,68 mM

- Medium für primäre Keratinozyten

SFM (serumfreies Medium)	Biochrom	500 ml
rEGF (rekombinanter epithelialer Wachstumsfaktor)	Biochrom	15 µl
BPE (Kälber-Hypophysenextrakt)	Biochrom	937,5 µl

- Medium für primäre Melanozyten

Medium 254CF	Invitrogen	500 ml
CaCl ₂	Invitrogen	500 µl
HMGS-2	Invitrogen	5 ml

- Weitere Zellkultur-Lösungen

HBSS (Hank's balanced salt solution)	Invitrogen
Trypsin/EDTA	Invitrogen
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen
Zeozin™ 100mg/ml	Invitrogen
0,2% EDTA in PBS	Eigenherstellung Apotheke Klinikum Großhadern

2.1.2. Transfektionsreagenzien

Lipofectamin™ RNAiMAX	Invitrogen
FuGENE®6	Roche

2.1.3. Oligonukleotide

2.1.3.1. Small Interfering RNAs (siRNAs)

Alle siRNA-Sequenzen wurden nach den unter Punkt 2.2.1.2. beschriebenen Richtlinien entwickelt und von Eurofins MWG Operon, Ebersberg, bezogen.

Tabelle 1: Sequenzen der verwendeten siRNAs

Bezeichnung	Gen	Sequenz (5' nach 3')
A1	BCL2A1	GGAAGAATTGTAACCATAT
APAF-1	APAF1	CAGAGGCUUCCACUAAUA
Bad	BAD	GGAUGAGUGACGAGUUUGU
Bcl-2	BCL2	GGGAGATAGTGATGAAGTA
Bcl-w	BCL2L2	GGCAGACTTTGTAGGTTAT
Bcl-xL	BCL2L1	GGAACCTCTATGGGAACAAT
Bid	BID	CUUGCUCGUGAUGUCUUU
Bik	BIK	CCACACUUAAGGAGAACAU
Bim	BCL2L11	CUACCUCCCUACAGACAGA
Ktrl. (Kontrolle)	-	GCGCAUCCAGCUUACGUA
Caspase 8	CASP8	GCUCUCCGAAUUAUAGA
Caspase 9	CASP9	GAUGCCUGGUUGCUUUAU
CREB1	Creb1	CAAUACAGCUGGCUAACA
FADD	FADD	ACGUCAUAUGUGAUAUGU
HIF1 α	HIF1A	CAATCAAGAAGTTGCATTA
IRF-1	IRF1	TCACCAAGAACCAGAGAAA
IRF-3	IRF3	CCTTCATTGTAGATCTGAT
Mcl-1	MCL1	GGCAGTCGCTGGAGATTAT
Noxa	PMAIP1	AGTCGAGTGTGCTACTCAA
p53	TP53	CCACCATCCACTACAATA
Puma	BBC3	CCGAGAUGGAGCCCAAUUA

2.1.3.2. Oligonukleotide für die *In-Vitro*-Transkription

Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon, Ebersberg, bezogen.

Tabelle 2: Sequenzen der für die *In-Vitro*-Transkription verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Oligonukleotid 5' nach 3'
Matrize vorwärts	TCAAACAGAGGTCGCATGCCTATAGTGAGTCGTATTAGAATTCGC
Matrize rückwärts	GCATGCGACCTCTGTTTGACTATAGTGAGTCGTATTAGAATTCGC
T7-Promotor-Primer	TAATACGACTCACTATA

2.1.3.3. Primer und Sonden für die quantitative RT-PCR

Für die Sonden-basierte qRT-PCR wurden Primer unter Verwendung der frei zugänglichen Online-Software (*Assay Design Center*) von Roche, Mannheim entwickelt, die geeigneten Sonden wurden automatisch von der Software ausgewählt. Oligonukleotid-Sonden wurden von Roche, die Primer von Eurofins MWG Operon, bezogen.

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Primer und zugehörige Sondennummer

Name	Vorwärts (5'nach3')	Rückwärts (5'nach3')	Sonde
A1	CAGGAGAATGGATAAGGCAAA	CCAGCCAGATTTAGGTTCAAA	#75
Bad	CGAGTTTGTGGACTCCTTTAAGA	CACCAGGACTGGAAGACTCG	#78
Bcl-2	TACCTGAACCGGCACCTG	GCCGTACAGTTCCACAAAGG	#75
Bcl-w	GATGGTGGCCTACCTGGAG	CGTCCCCGTATAGAGCTGTG	#28
Bcl-xL	GCTGAGTTACCGGCATCC	CTGAAGGGAGAGAAAGAGATTCA	#10
Bid	TGCAGCTCAGGAACACCA	TCTCCATGTCTCTAGGGTAGGC	#37
Bik	CCCTATGGAGGACTTCGATTC	GGCTCACGTCCATCTCGT	#28
Bim	GGCCCCTACCTCCCTACA	GGGGTTTGTGTTGATTTGTCA	#21
CREB1	CGGTGCCAACTCCAATTTAC	ATTGCTCCTCCCTGGGTAAT	#86
HIF1A	CAGCTATTTGCGTGTGAGGA	TTCATCTGTGCTTTCATGTCATC	#89
HPRT	TGACCTTGAATTTATTTGCATACC	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT	#73
IRF1	GAGCTGGGCCATTACACAC	TTGGCCTTCCACGTCTTG	#36
IRF3	AAGGAAGGAGGCGTGTGTTG	TTCCTTCCGTGAAGGTAATCA	#57
Noxa	GGAGATGCCTGGGAAGAA	CCTGAGTTGAGTAGCACACTCG	#67

2.1.4. Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide wurden bereits in anderen Studien beschrieben. Bezugsquellen und zugehörige Referenzen sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt.

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Name	Vektor-Grundgerüst	Insert	Beschreibung
pRL-CMV	pRL-CMV (Promega)	-	Renilla-Luziferase Kontrollvektor für Luziferase-Reporter Assays
wt-Noxa-luc	pGL3-Basic Vector (Promega)	Noxa-Promoter	Exprimiert die Firefly-Luziferase unter der Kontrolle des Wildtyp-Noxa-Promotors nach Lallemant et al. [75]
mutP53-Noxa-luc	pGL3-Basic Vector (Promega)	Noxa-Promoter, mutiert	Exprimiert die Firefly-Luziferase unter der Kontrolle des Noxa-Promotors mit Mutationen in der p53-Bindestelle nach Lallemant et al. [75]

mutIRF-Noxa-luc	pGL3-Basic Vector (Promega)	Noxa-Promotor, mutiert	Exprimiert die Firefly-Luziferase unter der Kontrolle des Noxa-Promotors mit Mutationen in der IRF-Bindestelle nach Lallemand et al. [75]
mutCRE-Noxa-luc	pGL3-Basic Vector (Promega)	Noxa-Promotor, mutiert	Exprimiert die Firefly-Luziferase unter der Kontrolle des Noxa-Promotors mit Mutationen in der CRE-Bindestelle nach Lallemand et al. [75]
pCFG5-IEGZ	pcDNA3.1/zeo	-	Retroviraler Expressionsvektor. Leervektor für die konstitutive Expression eines Gens unter Kontrolle des CMV-Promotors. EMCV-IRES vermittelte Co-Expression der Selektionsmarker EGFP-Zeo (EGZ) [76]
I κ B α -mut	pCFG5-IEGZ	I κ B α cDNA, mutiert	Retroviraler Expressionsvektor, Konstitutive Expression der dominant-negativ mutierten I κ B α cDNA (Ser32/36 nach Ala32/36) [76]
IKK2-DN	pCFG5-IEGZ	IKK2 cDNA, mutiert	Retroviraler Expressionsvektor, Konstitutive Expression der dominant-negativ mutierten IKK2 cDNA (fehlende Kinase-Domäne) [76]

2.1.5. Antikörper

Tabelle 5: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper

Primäre Antikörper		Hersteller
Ziege-Anti-Noxa	(N-15)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Maus-Anti-p53	(Ab-6)	Merck Biosciences, Darmstadt
Maus-Anti-Bax		Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Maus-Anti-Bcl-2	(Ab-1)	Merck Biosciences, Darmstadt
Maus-Anti-Caspase 8	(1C12)	New England Biolabs, Frankfurt
Maus-Anti-Mcl-1	(22)	BD Bioscience, Heidelberg
Maus-Anti- α -Tubulin	(DM1A)	Sigma, Taufkirchen
Karnickel-Anti- β -Aktin	(AC-15)	Sigma, Taufkirchen
Karnickel-Anti-A1	(FL-175)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Karnickel-Anti-Bak		New England Biolabs, Frankfurt
Karnickel-Anti-Bcl-w		New England Biolabs, Frankfurt
Karnickel-Anti-Bcl-xL		New England Biolabs, Frankfurt
Karnickel-Anti-Caspase 9		New England Biolabs, Frankfurt
Karnickel-Anti-Puma	(bbc3)	Sigma, Taufkirchen
Sekundäre Antikörper		Hersteller
Anti-Maus IgG-HRP		New England Biolabs, Frankfurt
Anti-Karnickel IgG-HRP		New England Biolabs, Frankfurt
Esel-Anti-Ziege IgG-HRP		Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

2.1.6. Kommerziell erhältliche Komplettsysteme

Kit	Hersteller
ECL Plus™	GE Healthcare, München
Lightcycler® TaqMan® Master	Roche, Mannheim
MEGAscript™ T7 Kit	Applied Biosystems/Ambion, Darmstadt
NucleoSpin® Plasmid QuickPure	Macherey-Nagel, Düren
Pierce BCA Protein Reagent Kit	Thermo Fisher Scientific, Bonn
Reverse Transkriptase	Roche, Mannheim
RNeasy™ Mini Kit	Qiagen, Hilden

2.1.7. Apparative Ausstattung

Gerät	Hersteller
CO2-Inkubator Heraeus	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer FACScan	Perkin-Elmer, Waltham, USA
Entwickler für Röntgenfilme X-Omat	Kodak, Stuttgart
Fluoreszenzmikroskop Axioskop	Zeiss, München
Fluorimeter Cytofluor 2350	Millipore, Schwalbach
Kamera Axiovision Mrc und Mrc 5	Zeiss, München
Luminometer GloMAX® 96	Promega, Mannheim
Nukleinsäure-Elektrophoresekammer	Biorad, München
PCR-Gerät Robocycler™	Stratagene, Heidelberg
Photometer SmartSpec 3000	Biorad, München
Protein-Elektrophorese XCell	Invitrogen, Darmstadt
SureLock™ Mini-Cell System	
qRT-PCR-Gerät Lightcycler™ 2.0	Roche, Mannheim
Sterilwerkbank Herasafe	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge (5415 C)	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge, gekühlt (5810 R)	Eppendorf, Hamburg
XCell II™ Blot Module	Invitrogen, Darmstadt
Zentrifuge, mitteltourig, gekühlt (RC5B)	Sorvall, Bad Homburg

2.1.8. Puffer und Lösungen

Cold Spring Harbor (CSH)-Puffer zur Gesamtzellprotein-Präparation

Stock	Menge für 1 ml
5xCSSH-Stock	200 µl
250 mM Tris, pH7.4	Sigma
1,25 mM NaCl	Sigma
5 mM EDTA	Sigma
10% Triton X	10 µl
1ml Triton X 100 ad 10 ml H ₂ O	Sigma
7x Proteaseinhibitoren	150 µl
1 Tablette Complete, Mini auf 1,5 ml H ₂ O	Roche
10x Phosphataseinhibitoren	100 µl
1 Tablette PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail auf 1 ml H ₂ O	Roche
H ₂ O bidest.	540 µl

Reagenzien für Immunoblot nach Lämmli

- 1x Laufpuffer

Stock	Menge für 1 l
20x MES SDS Running Buffer	Invitrogen
H ₂ O bidest.	Apotheke Klinikum Großhadern
Antioxidanz	Invitrogen
	0,5 ml/ 200 ml

- 1x Transferpuffer für Immunoblot nach Lämmli

Stock	Menge für 500 ml
20x Transferpuffer	Invitrogen
Methanol, absolut	Merck
Antioxidanz	Invitrogen
H ₂ O bidest.	Apotheke Klinikum Großhadern
	ad 500 ml

- 1x Blockierlösung für Immunoblot nach Lämmli

Stock	Menge für 500 ml
Blocking Solution	Roche
Natriumfluorid (0,5 M)	Sigma
PBS	450 ml

- 1x Waschpuffer für Immunoblot nach Lämmli

Stock		Menge für 500 ml
Tween20	Sigma	0,5 ml
PBS	Apotheke Klinikum Großhadern	500 ml

Reagenzien für Durchflusszytometrie (FACS)-Analyse

- Annexin V -Färbung

Stock		Menge für 50 µl
Annexin V Fluos	Roche	1 µl
ANPI-Färbepuffer		49 µl
10 mM	HEPES/NaOH pH7,4	Sigma
140 mM	NaCl	Sigma
5 mM	CaCl ₂	Sigma

- Propidiumjodid-Färbelösung

Stock		Menge für 50 µl
6x Propidiumjodid (5 µg/ µl)		10 µl
1 µl	Propidiumjodid (50mg/ml)	FLUKA/Sigma
9 µl	PBS	
ANPI-Färbepuffer		50 µl

Reagenzien für Reporter-Analysen

Bezeichnung	Hersteller	
5x Passive Lysis Buffer	Promega	
ATP Substrat	Biothema, Handen, S	
Luziferase Substrat	Biothema, Handen, S	
Coelentarazine	Promega	1 µg zu lösen in 1 ml Methanol

Alkoholische Lösungen

Bezeichnung	Hersteller
Chloroform	Merck
Ethanol, absolut, pro analysi	Merck
Glycerin, etwa 87%, pro analysi	Merck
Isopropanol	Merck
Methanol, gradient grade	Merck

Phenol-Chlorophorm-Isoamylalkohol (25:24:1)

Sigma

Therapeutische Wirkstoffe

Bezeichnung	Hersteller
ABT-737	Abbott Laboratories, Illinois, USA
5-Flourouracil (5-FU)	Apotheke Klinikum Großhadern, München

Reagenzien für die Bakterien-Zucht

Bezeichnung	Hersteller	Gebrauchslösung
LuriaBroth (LB) -Medium	Sigma	12,5 g/500 ml H ₂ O, autoklaviert
Select-Agar	Invitrogen	7,5 g/500 ml LB-Medium, autoklaviert
Ampicillin (100 mg/ml)	Sigma	1 µl/ml Medium oder Agar

Sonstige Reagenzien

Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma
dNTPs	Mischung aus dATP, dGTP, dCTP, dTTP (Roche), jeweils 10µM in H ₂ O PCR grade
Exo-Minus-Klenow-DNA-Polymerase	New England Biolabs
poly(I:C)	GE Healthcare, München
RNAse freies Wasser	Diethylpyrocarbonat (Sigma) 0,1% (v/v) in H ₂ O bidest., autoklaviert

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur und zellbasierte Assays

2.2.1.1. Kultivierung von Zellen

Primäre humane Fibroblasten wurden in Vollmedium (DMEM/ 10% FKS), humane Keratinozyten in serumfreiem Medium (SFM) mit Zusatz von rekombinantem epidermalen Wachstumsfaktor und Kälber-Hypophysenextrakt kultiviert. Primäre humane Melanozyten wurden in 254CF Medium unter Zusatz von HMGS-2 (*Human Melanocyte Growth Supplement*) kultiviert. Humane Melanomzelllinien (freundlicherweise von Prof. Dr. Meenhard Herlyn vom Wistar-Institut, Philadelphia, USA zur Verfügung gestellt), wurden in Tumormedium 2% (TU2%) kultiviert. Die Phoenix-Ampho Zelllinie wurde in Vollmedium (DMEM/ 10% FKS) kultiviert. Alle Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen (Nunc) bei 37 °C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert.

Bei 80-90% Konfluenz wurden adhärenente Zellen zur Passagierung mit 1 ml Trypsin bei 37 °C von der Kulturflasche abgelöst. Nach 3 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 9 ml Vollmedium abgestoppt und die abgelösten Zellen in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die bei 1000 Umdrehungen pro Minute (rpm) über 5 min sedimentierten Zellen wurden anschließend in geeignetem Medium entsprechend ihrer Kulturdichte verdünnt und erneut in Kulturflaschen ausgesät. Für weitere Versuche wurden die abgelösten Zellen in der Neubauer Zählkammer gezählt und zu 60-70% Konfluenz in Multilochplatten (6- oder 12-Loch, Greiner Bio-one) oder 10 cm Kulturschalen in dem jeweiligen Medium ausgesät und bis zur Verwendung bei 37 °C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert.

2.2.1.2. Hemmung der Genexpression mittels RNA-Interferenz (RNAi)

Die RNA-Interferenz ist ein zelleigener Mechanismus, der für die sequenzspezifische Regulation von Zellfunktionen verantwortlich ist. Die RNAi dient zum Schutz der Zellen gegen virale Infektionen. Sie stabilisiert das Genom durch Hemmung der Transposons und reguliert die Genexpression durch endogene micro RNAs (miRNAs). Der Mechanismus dass durch kurze doppelsträngige RNAs (dsRNAs) die Expression spezifischer Gene inhibiert werden kann wurde erstmals 1998 von Fire und Mello [77] beschrieben und ist heute eine etablierte Methode, gezielt spezifische Gene zu hemmen. Die RNA-Interferenz verläuft in 2 Schritten: Zunächst wird die doppelsträngige, zytoplasmatische RNA durch das Enzym Dicer in 21-23 Nukleotide (nt) lange RNA-Duplexe, den sogenannten „small interfering dsRNA“ (siRNA) zerteilt [78]. Diese werden anschließend in einen Multiproteinkomplex, den *RNAi-Induced Silencing Complex* (RISC) inkooperiert und dienen hier als Matrize für die Bindung und den endonucleolytischen Abbau homologer mRNAs [79]. Durch das direkte Einbringen von 21 Nukleotiden langen synthetischen siRNAs in Säugerzellen kann dieser Mechanismus für eine sequenzspezifische Hemmung der Genexpression genutzt werden.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten siRNAs wurden nach den publizierten Algorithmen von Reynolds [80] und Ui-Tei [81] entworfen.

2.2.1.3. Transfektionen

2.2.1.3.1. *Transfektion von siRNAs*

Zellen wurden zu 60-70% Konfluenz einen Tag vor der Transfektion in 6-Loch-Kulturplatten ausgesät. 1 µl der siRNA (20 µM) wurden in 84 µl serumfreiem Medium (OptiMEM, Invitrogen) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß verdünnt. In einem weiteren 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden in 84 µl OptiMEM 0,83 µl Lipofectamin RNAiMax (Invitrogen) verdünnt. Beide Lösungen wurden 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Im Falle einer gleichzeitigen Hemmung von zwei Genen wurde die doppelte Menge Lipofectamin RNAiMax verwendet. Die siRNA-Lösung und die RNAiMax Lösung wurden im Anschluß langsam gemischt und zur Komplexierung der siRNA für 15-20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das Medium der zu transfizierenden Zellen abgenommen und durch 830 µl frisches Kulturmedium ersetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die komplexierten siRNAs in die einzelnen Löcher der Kulturplatte tröpfchenweise zugegeben. Die Konzentration jeder siRNA betrug 20 nM in einem Volumen von 1 ml. Die Effizienz der verwendeten siRNAs wurde auf mRNA-Ebene durch qRT-PCR, auf Proteinebene mittels Immunoblot untersucht.

In Experimenten, die im Ergebnisteil unter Punkt 3.1. aufgeführt sind, wurden die Effekte der Einzel- und der Doppelhemmung direkt verglichen. Um dies zu ermöglichen, wurde in den Experimenten die gleiche Menge RNA eingesetzt. Bei der Einzelhemmung wurden 1 µl siRNA zusammen mit 1 µl Kontroll-siRNA transfiziert.

2.2.1.3.2. *Transfektion der virusähnlichen RNAs*

Zellen wurden zu 60-70% Konfluenz einen Tag vor der Transfektion in 6-Loch-Kulturplatten ausgesät. 4 µl der pppRNA (250 ng/ µl) oder 1 µl poly(I:C) (3 ng/ µl) wurden in 84 µl serumfreiem Medium (OptiMEM, Invitrogen) verdünnt. Im gleichen Volumen OptiMEM wurden 1,6 µl Lipofectamin RNAiMax (Invitrogen) verdünnt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde verfahren wie bei der Transfektion von siRNAs. Nach spätestens 17 h Inkubation wurden Apoptose- bzw. Zellvitalitätsmessungen, mRNA-Analysen oder Proteinanalysen durchgeführt.

2.2.1.3.3. *Transfektion von Expressionsplasmiden*

Für die ektopische Expression bestimmter Proteine wurden die entsprechenden Vektoren wie folgt transfiziert: 3 µl Fugene®6 Transfektionsreagenz wurden in 50 µl serumfreien Medium (OptiMEM) verdünnt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1 µg des jeweiligen Plasmids zugegeben und das Transfektionsgemisch zur Komplexierung 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zellen wurden zu 60-70% Konfluenz einen Tag vor dem Versuch in 6-Loch-Platten ausgesetzt. Das Kulturmedium wurde durch 950 µl frisches Medium ersetzt und der Transfektionsansatz tröpfchenweise zugegeben. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und nach 48 h wurden die Zellen für weitere Versuche verwendet.

2.2.1.4. Retroviraler Gentransfer: Generierung NF- κ B-defizienter Zellen

2.2.1.4.1. Produktion von Retroviren

Für die Produktion von Retroviren wurde die Phoenix-Ampho Verpackungszelllinie verwendet. Diese Zellen exprimieren stabil die für die Virusproduktion notwendigen Proteine gag, pol und env. Vier Millionen Phoenix-Ampho Produzentenzellen wurden in Vollmedium in 10 cm-Zellkulturschalen ausgesät. 35 μ l Fugene®6 wurden in 500 μ l OptiMEM verdünnt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10 μ g retrovirales Expressionsplasmid zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium der Phoenix-Zellen wurde durch 6 ml frisches Medium ersetzt und das komplexierte Expressionsplasmid zugegeben. Nach 17 h wurde das Medium gewechselt und nach weiteren 48 h der Virus im Überstand geerntet und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.2.1.4.2. Infektion und Selektion von Melanomzellen

1205Lu-Melanomzellen wurden zu 60-70% Konfluenz in 6-Lochplatten ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und 1 ml Virenüberstand pro Bedingung zugegeben. Nach 24 Stunden wurde die Infektion wiederholt. Nach weiteren 24 h wurde der Virenüberstand durch Selektionsmedium (400 μ g Zeocin je ml Medium) ersetzt. Nach 10 Tagen Selektion konnten die Zellen für weitere Versuche verwendet werden.

2.2.1.5. Cell Titer Blue®: Messung der Zell-Vitalität

Der CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (Promega) diente zur Bestimmung der Vitalität von kultivierten Zellen. Bei diesem fluoreszenzbasierten Test wird zum Kulturmedium der Zellen eine dunkelblaue Pufferlösung (Farbstoff: Resazurin) gegeben. Durch den Stoffwechsel intakter Zellen wird die oxidierte Form des Farbstoffs zur rötlichen Verbindung Resafurin reduziert. Dieser Farbumschlag kann fluorimetrisch detektiert werden (Absorptionsmaximum 560 nm) und gibt Auskunft über den Anteil der lebenden, stoffwechselaktiven Zellen einer Gesamtpopulation. Umgekehrt kann eine Abnahme der Stoffwechselaktivität auf Zellsterben hinweisen. Für die Durchführung des Assays wurde das Kulturmedium von Zellen in einer 6-Loch-Kulturplatte abgenommen und durch 750 μ l frisches Medium ersetzt. Dazu wurden 150 μ l CellTiterBlue®-Reagenz gegeben, durch leichtes Schütteln gleichmäßig verteilt und anschließend bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 60 min wurden 100 μ l der Probe in eine 96-Loch-Zellkulturplatte überführt. Ein Referenzwert aus der Reaktion von 750 μ l sterilem Kulturmedium mit 150 μ l CellTiterBlue®-Reagenz wurde mitgeführt. Die Messung wurde an einem Cytofluor 2350 Fluorimeter der Firma Millipore bei einem Absorptionsmaximum von 560 nm und einem Emissionsmaximum von 590 nm durchgeführt.

2.2.1.6. Quantifizierung apoptotischer und toter Zellen: Annexin V und Propidiumiodid-Färbung

Für die Bestimmung der Zelltodinduktion wurden zwei verschiedene Farbstoffe verwendet, um zwischen toten und sich in der Apoptose befindlichen Zellen zu unterscheiden. Für die Bestimmung von apoptotischen Zellen wurde der Mechanismus genutzt, dass Phosphatidylserin (PS) während der Apoptose von der Innenseite der Doppelmembran auf die extrazelluläre Seite wechselt und hier nachgewiesen werden kann. Das Protein Annexin V kann PS spezifisch binden und damit die bei Apoptose auftretenden Membranveränderungen messbar machen. Das verwendete Annexin V (AN) ist mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) gekoppelt und kann nach einer Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm im Durchflusszytometer gemessen werden. Für den Nachweis toter Zellen wurde Propidiumiodid (PI) verwendet, welches unspezifisch in doppelsträngige DNA interkaliert, die Zellmembran von gesunden Zellen jedoch nicht durchdringen kann. Daher kann es in der Durchflusszytometrie zur Diskriminierung von lebenden und toten Zellen mit permeabler Zellmembran verwendet werden. Es lagert sich etwa alle 4 bis 5 Basen ein PI-Molekül in die DNA ein. Als Folge dieser Bindung verändert sich das Absorptionsmaximum von PI von 488 nm nach 535 nm bzw. das Emissionsmaximum von 590 nm nach 617 nm.

Zur Quantifizierung apoptotischer und toter Zellen wurden adhärenente Zellen mit PBS gewaschen, durch Zugabe von Trypsin von der Kulturschale abgelöst und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS (Zentrifugation bei 2.600 rpm und 4 °C für 3 min) wurden die sedimentierten Zellen in 50 µl Annexin-Färbelösung aufgenommen und für 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Pro 50 µl Annexin-Färbelösung wurde 1 µl FITC-markiertes Annexin V zugegeben. Nach der Inkubation wurden weitere 50 µl Färbepuffer und 10 µl PI, zugegeben und die Messung mit einem FACScan-Durchflusszytometer der Firma Perkin-Elmer durchgeführt. Insgesamt wurden pro Bedingung 10.000 Zellen, bei sehr geringer Zellzahl mindestens 5.000 Zellen gemessen.

Zur Bestimmung der Anzahl apoptotischer und toter Zellen einer Gesamtpopulation wurden Punkt-Histogramme (dot plots) erstellt. Bei dieser Form der Darstellung sind entlang der X-Achse die Annexin V-positiven und entlang der Y-Achse die Propidiumiodid-positiven Zellen aufgetragen. Jeder Punkt entspricht einer Zelle. Die Gesamtpopulation kann so in vier Teilpopulationen untergliedert werden. In *Abbildung 6* ist beispielhaft ein Punkt-Histogramm dargestellt. Im linken unteren Quadranten befinden sich AN/PI-negative Zellen, also intakte Zellen, die sich weder in der Apoptose befinden noch tot sind. Im rechten unteren Quadranten befinden sich Zellen, die ausschließlich AN-positiv sind, sich also gerade in der Apoptose befinden, während ihre Zellmembran noch intakt ist. Im rechten oberen Quadranten sind doppelt positive Zellen zu finden, das heisst Zellen die bereits tot sind. Es ist in diesem Fall nicht mehr zu unterscheiden, ob die Zellen durch Apoptose oder Nekrose zugrunde gegangen sind. Im linken oberen Quadranten befinden sich ausschließlich PI-positive, also ebenfalls tote Zellen.

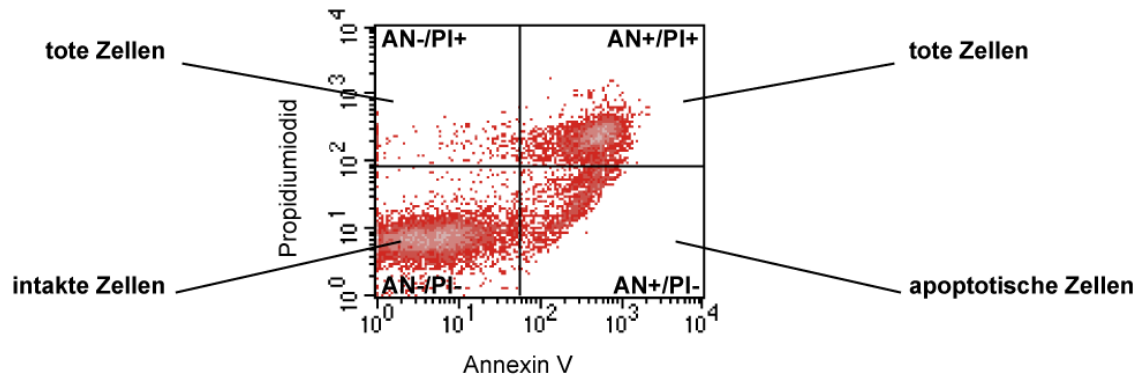


Abbildung 6: Beispiel einer Punkt-Histogramm-Auswertung der FACS-Analyse. AN: Annexin V, PI: Propidiumiodid

Für die Analyse des Zelltodes wurde die Summe der sterbenden Zellen (AN-positiv) und der toten Zellen (PI-positiv und AN/PI-doppelt positiv) gebildet.

2.2.2. Proteinbiochemische Verfahren

2.2.2.1. Proteinisolation aus Säugerzellen

Zur Isolation des Gesamtzellproteins wurden die adhärenenten Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin von der Zellkulturschale abgelöst. Die Reaktion wurde mit DMEM/ 10% FKS gestoppt und die Zellen 3 min bei 2600 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das Sediment wurde weitere zweimal mit 1 ml PBS gewaschen, und anschließend in 50 µl 1x CSH-Puffer versetzt mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren (Roche) aufgenommen und zur Zelllyse 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (20 min, 13200 rpm, 4 °C) wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei – 80 °C gelagert.

2.2.2.2. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Pierce

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Pierce BCA Protein Reagent Kit (Thermo Scientific) verwendet. Die im Reagenz enthaltenen zweiwertigen Kupferionen reagieren mit Protein zu einwertigen Kupferionen. Diese bilden mit Bicinchoninsäure einen violetten Farbstoff, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch bestimmt werden kann. Die im Kit enthaltenen Reagenzien A und B wurden im Verhältnis 1:50 gemischt. 1 ml dieser Lösung wurde in Halbmikroküvetten vorgelegt und je 10 µl Proteinlysate zugegeben. Die Proben wurden kurz gemischt (Vortex) und nach 20 min Inkubation im dunklen bei Raumtemperatur bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte mittels einer Eichgerade aus in 1x CSH-Lysepuffer verdünntem bovines Serumalbumin (BSA, New England Biolabs, 10 mg/ ml) in Verdünnungsschritten von 80, 40, 20, 10, 5 und 2,5 mg/ ml. Als Referenz wurden 10 µl CSH-Lysepuffer verwendet.

2.2.2.3. Immunoblot nach Laemmli

2.2.2.3.1. Denaturierende Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde das XCell SureLock™ Mini-Cell System von Invitrogen verwendet. Die Proben wurden wie folgt aufbereitet: 5-10 µg Gesamtprotein wurde mit deionisiertem Wasser, 6 µl NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X) und 2,4 µl NuPAGE® Reducing Agent (10X) zu einem Gesamtvolumen von 24 µl vermischt und 10 min bei 70 °C denaturiert. 20 µl der Probe wurden je Tasche des NuPAGE® Novex Bis-Tris Gels (10 Taschen) geladen. Als Größenstandard wurden 15 µl des SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard verwendet. Die innere Kammer wurde mit 200 ml 1x MES SDS Running Buffer (Invitrogen) gefüllt und mit 500 µl NuPAGE® Antioxidant versetzt. Die äußere Kammer enthielt 800 ml 1x MES SDS Running Buffer. Die Laufzeit des Gels betrug ca. 40 min bei konstanten 150V.

2.2.2.3.2. Transfer der Proteine auf eine PVDF Membran

Der Transfer der nach Größe und Ladung aufgetrennten Proteine von einem Gel auf eine Invitrolon PVDF-Membran (Invitrogen) erfolgte mit dem XCell II Modul (Invitrogen). Die benötigten Blotting-Pads (Invitrogen) sowie das Filterpapier (Invitrogen) wurden in 1x Transfer-Puffer (1x NuPAGE® Transferpuffer (20x), 0,1% NuPAGE® Antioxidant, 10% Methanol für den Transfer von einem Gel bzw. 20% Methanol für den Transfer von 2 Gelen) eingeweicht. Die Anordnung in dem XCell Modul war wie folgt: Kathode - Zwei Pads – Filterpapier – Gel – Membran – Filterpapier - Pad - Gel – Membran – Filterpapier - zwei Pads - Anode. Das Modul wurde mit 1x Transferpuffer aufgefüllt. Zur Kühlung wurde die äußere Kammer mit Wasser gefüllt und der Elektroblot 70 min bei konstanten 30V durchgeführt. Die Membranen wurden im Anschluss eine Stunde lang in Blockierlösung (Roche) bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungen des primären Antikörpers zu minimieren.

2.2.2.3.3. Detektion spezifischer Proteine

Für den Nachweis bestimmter Proteine auf der Membran wurden erst primäre Antikörper je nach Herstellerangaben in Blockierlösung (Roche) oder 5% BSA in PBS/0,1% Tween20 verdünnt und über Nacht bei 4° C unter leichtem Schütteln auf die Proteine hybridisiert. Die Membran wurde dreimal für 10 min in PBS/ 0,1% Tween20 gewaschen und anschließend mit dem in Blockierlösung nach den Angaben des Herstellers verdünnten, Horse Raddish Peroxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörpern für eine Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Membran wurde danach erneut dreimal gewaschen. Für die Lichtreaktion wurden Membranen mit 1 ml Enhanced Chemoluminescence (ECL) Plus Western Blotting Detection Reagent (Amersham) für 5 min im Dunkeln inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels ECL Hyperfilm-Filmen der Firma GE Healthcare. Die belichteten Filme wurden mit einem X-omat 1000-Gerät der Firma Kodak entwickelt.

2.2.3. Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.2.3.1. Gewinnung von Plasmid-DNA

2.2.3.1.1. Transformation von Bakterien

Für die Transformation wurden 200 µl chemisch kompetenter One Shot Stbl3- Bakterien (Invitrogen) oder DH5α auf Eis angetaut, mit 10 ng Plasmid-DNA vermengt und 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde das Gefäß für 90 sec in einem Wasserbad auf 42 °C erhitzt und im Anschluss sofort 2 min auf Eis abgekühlt. Es wurden 800 µl LB-Medium hinzugefügt und die Bakteriensuspension 1 h bei 37 °C im Schüttler (300 rpm) inkubiert. Anschließend wurden 50-100 µl auf Selektionsagarplatten (1 µg/ ml Ampicillin) ausplattiert und die Bakterien über Nacht im Brutschrank wachsen gelassen. Es wurden je 5 Kolonien entnommen, in 5 ml ampicillinhaltigem LB-Medium hochgewachsen und davon Glycerolstocks (800 µl Bakterien-suspension + 200 µl Glycerol) angelegt und bei -80 °C gelagert.

2.2.3.1.2. Plasmid-DNA-Minipräparation

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA wurden über Nacht 5 ml Bakterienkulturen aus den jeweiligen Glycerolstocks angelegt. 250-500 µl dieser Kultur wurden in 250 ml ampicillinhaltiges LB-Medium gegeben und die Kultur weitere 16 h bei 37 °C im Schüttler wachsen gelassen. Die Bakterien wurden bei 3000 g/ 4 °C für 30 min in 5 x 50 ml Röhrchen pelletiert. Die Pellets wurden bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Isolation der DNA aus den Bakterien-Pellets erfolgte mit dem NucleoSpin PlasmidQuickPure Kit von Macherey Nagel. Die Pellets wurden in der 8-fachen Menge Lysepuffer aufgenommen und laut Herstellerangaben über die Säulen aufgereinigt.

2.2.3.2. Präparation von Ribonukleinsäuren (RNA)

Im 6-Loch-Format kultivierte Zellen wurden 2 mal in HBSS gewaschen und anschließend in 1 ml QIAzol (Qiagen) lysiert. Das Lysat wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit einem Zellschaber von der Kulturplatte abgelöst und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lysate wurden mit 200 µl Chloroform versetzt, 15 sek stark geschüttelt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert bis sich zwei Phasen ausgebildet hatten. Zur Phasentrennung wurden die Proben 15 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die oberste wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 700 µl 70%igem Ethanol versetzt. Die weitere Isolation erfolgte nach Herstellerangaben mit dem RNeasy Mini Kit (QIAGEN). Isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.3.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration präparierter DNA und RNA wurde in einer Quarzküvette photometrisch (Photometer: Smartspec 3000) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Proben wurden 1:20 in H₂O-DEPC verdünnt und aus der Extinktion der Lösung wurde die

Konzentration berechnet. Eine Optische Dichte (OD) von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 ng/ µl, bei RNA einer Konzentration von 40 ng/ µl. Die Berechnung erfolgte demnach wie folgt:

Konzentration DNA (ng/ µl) = OD bei 260 nm * Verdünnungsfaktor 20 * 50 ng/ µl

Konzentration RNA (ng/ µl) = OD bei 260 nm * Verdünnungsfaktor 20 * 40 ng/ µl

Mögliche Verunreinigungen der Probe mit Proteinen oder Lösungsmitteln wurde durch die Bestimmung der Extinktion bei 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen aufgrund aromatischer Aminosäurereste) ermittelt. Das Verhältnis der OD₂₆₀ zur OD₂₈₀ zeigt an, wie stark eine Probe noch durch Alkohol und Reste von Proteinen verunreinigt ist. Ein Verhältnis von 1,8 spricht für eine reine DNA-Isolierung, ein Verhältnis von 2,0 für eine reine RNA-Isolierung. Ist die Nukleinsäure-Lösung kontaminiert, so ist der Wert signifikant kleiner. Für alle Proben wurde eine Ratio von 1,6-2,0 als ausreichende Qualität der Probe angesehen.

2.2.3.4. Quantifizierung der Genexpression mittels qRT-PCR

2.2.3.4.1. Reverse Transkription von mRNA: cDNA-Synthese

Die isolierte RNA muss vor der Quantifizierung mittels qRT-PCR in DNA umgeschrieben werden, da bei der PCR spezifische DNA-Polymerasen verwendet werden, die nicht in der Lage sind, RNA zu amplifizieren. Hierzu wird eine Reverse Transkriptase (RT) verwendet, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, mit deren Hilfe RNA in copy-DNA (cDNA) umgeschrieben werden kann. In einem ersten Schritt wurde 300 bis 1000 ng RNA mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 8,5 µl aufgefüllt und 2 µl (500 ng) Oligo-dT-Primer (p(DT)15, Eurofins MWG) hinzugefügt. Zur Hybridisierung der Primer an den poly-A-Abschnitt des 3'-Endes der mRNA wurde die Probe 10 min lang bei 65 °C inkubiert, um eine komplette Denaturierung der RNA zu erreichen, und danach sofort abgekühlt, um eine vollständige Hybridisierung der Primer zu erzielen. Für die Synthese des DNA-Stranges wurde die Expand Reverse Transcriptase (Roche) verwendet und die Reaktion laut Herstellerangaben angesetzt. Je Reaktion wurde 4 µl First Strand Buffer, 2 µl Dithiothreitol (DTT), 2 µl Natrium-Desoxyribonukleosidtriphosphate (Na-dNTPs, enthält 10 mM jedes dNTPs, Roche), 0,5 µl RNasin (Rekombinanter RNasin RNase-Inhibitor, Promega) und 1 µl des Enzyms Reverse Transkriptase zu einem Gesamtvolumen von 20 µl zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurde der 20 µl-Ansatz mit H₂O/ DEPC auf 60 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und je 3 µl in die qRT-PCR eingesetzt oder bei -80° C gelagert.

2.2.3.4.2. Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Echtzeit-PCR basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Für die Quantifizierung wird mithilfe von Fluoreszenz-Farbstoffen neben der Nukleinsäurevervielfältigung auch eine Lichtreaktion herbeigeführt, die nach jedem einzelnen PCR-Zyklus erfasst wird. Für die Erzeugung der Lichtreaktion können entweder fluoreszierende, in die DNA interkalierende Farbstoffe verwendet werden oder

fluoreszenzmarkierte Sonden eingesetzt werden. In beiden Fällen wird die Tatsache genutzt, dass die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zunimmt und somit die Amplifikation der Ausgangs-DNA in Echtzeit ermöglicht. Die Quantifizierung wird in der exponentiellen Phase der Reaktion vorgenommen, da nur in dieser Phase der PCR optimalen Reaktionsbedingungen herrschen (Optimales Verhältnis von Template, Primern und DNA-Polymerase; Ausreichende Menge an dNTPs; wenig Nebenprodukte). Der Anfang der exponentiellen Phase der Reaktion wird Threshold Cycle ("Schwellenwert-Zyklus"), CT-Wert oder auch als „Crossing Point“ (CP) bezeichnet. Während diesem Amplifikationszyklus übersteigt die gemessene Fluoreszenz erstmals signifikant die Hintergrund-Fluoreszenz.

Bei jeder Reaktion werden zusätzlich zu den zu untersuchenden Proben auch Proben in einer Verdünnungsreihe amplifiziert, um daraus eine Standardkurve für die Reaktion zu erstellen. Mit Hilfe dieses Standards kann durch den CT-Wert der Probe eine Aussage über die Menge (relativ zum Standard) an amplifizierter cDNA getroffen werden. Für die Normierung wird neben dem Zielgen ein Referenzgen gemessen, welches ubiquitär und ohne größere Schwankungen in der Zelle exprimiert wird. Dieses sogenannte „Housekeeping“-Gen wird zur Normierung mit dem Zielgen verrechnet. In dieser Arbeit wurde als Referenz-Gen ein Enzym des Purin-Metabolismus, die Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) verwendet.

Für die Herbeiführung der Lichtreaktion wurden kurze LNA (locked nucleic acids)-haltige Hybridisierungssonden der Firma Roche verwendet. LNAs sind Nukleinsäuren, deren Zuckeranteil chemisch modifiziert wurde, wodurch die LNA eine höhere Bindungsaffinität aufweist als die natürlich vorkommende DNA oder RNA, und somit bei gleicher Temperatur wie die längeren Primer (20-25nt) an die DNA hybridisieren. Die Lichtreaktion wird bei den verwendeten LNA-Sonden erst bei Abbau der Sonde durch die verwendete DNA-Polymerase erzeugt, welche zusätzlich über eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität verfügt. Die Sonden sind am 3'-Ende mit einem sogenannten Quencher gekoppelt, welcher durch die räumliche Nähe die Lichtemission des 5'-gekoppelten Fluorophors unterdrückt. Während der Amplifikation der Ausgangs-DNA wird die Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase abgebaut und Fluorophor und Quencher räumlich getrennt, wodurch die Lichtemission nicht mehr unterdrückt wird und detektiert werden kann.

Für die Durchführung der PCR wurden geeignete Hybridisierungssonden und Primer-Paare mit der frei zugänglichen Online-Software, dem „*Assay Design Center*“ der Firma Roche (www.universalprobelibrary.com) ausgewählt (Aufgeführt unter Punkt 2.1.3.3.). Unter Verwendung des Lightcycler® TaqMan® Master-Kits von Roche wurden für jeden Ansatz gleichermaßen 4,5 µl H₂O mit 0,1 µl spezifischer LNA-Sonde, 0,2 µl je Primer (Konz: 10 µM) und 2 µl Reaction Master Mix (mit Enzym) vermengt. Die Ansätze wurden in Glaskapillaren (LightCycler® Capillaries (20 µl), Roche) pipettiert, und jeweils 3 µl der zu untersuchenden cDNA zugefügt. Die Kapillaren wurden 1 min bei 1000 rpm in einer Tischzentrifuge bei Raumtemperatur abzentrifugiert und anschließend die qRT-PCR in einem LightCycler® 2.0 Instrument unter nachfolgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt.

Initiale Denaturierung	1 Zyklus	94 °C/ 10 min
Amplifikation/Quantifizierung	45 Zyklen	94 °C/ 10 sek 60 °C/ 30 sek 72 °C/ 1 sek
Abkühlung auf 40° C		0,1 °C/ sek

Die relative Quantifizierung erfolgte unter Verwendung der LightCycler® Software, welche die relative Menge an Ausgangsmaterial in Bezug auf den verwendeten Standard berechnet. Anschließend wurde auf die Expression des HPRT-Gens normiert.

2.2.3.5. *In-Vitro*-Transkription

Die 5'Triphosphat konjugierte RNA wurde mittels *In-Vitro*-Transkription von Oligonukleotiden synthetisiert. Die verwendeten DNA-Matrizen enthielten neben der Zielsequenz noch eine T7-Promotorsequenz. Als Zielsequenz wurde eine im humanen System nicht aktive siRNA-Sequenz gegen murines Bcl-2 verwendet. Die verwendeten Oligonukleotide sind unter Punkt 2.1.3.2. aufgeführt.

Zur Anlagerung des T7-Promotorprimers wurde in einem ersten Schritt jeweils für die Synthese des Sense-Stranges und des Antisense-Stranges 22,5 µl DNA-Matrize (Konz. 100 µM) und 22,5 µl T7-Promotor-Primer (konz. 100 µM) mit 1 µl 0,5 M MgCl₂ und 1,3 µl 1 M Tris vermengt, auf 95 °C erhitzt und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die überhängenden Enden wurden mithilfe der Exo-Minus-Klenow DNA-Polymerase und Zugabe von dNTPs laut Herstellerangaben aufgefüllt, so dass zwei lineare doppelsträngige DNAs (Sense-DNA und Antisense-DNA) entstanden, welche als Matrizen für die *In-Vitro*-Transkription dienten. Die Matrizen wurden anschließend jeweils unter Verwendung des MEGAshortscript™ Kit (Ambion) zu einzelsträngiger 5'Triphosphat-RNA (pppRNA) nach Herstellerangaben umgeschrieben. Zur Herstellung von doppelsträngiger pppRNA wurden die Ansätze für den Sense-Strang und den Antisense-Strang nach 24 h Inkubation vermengt und das Reaktionsgemisch weitere 48 h bei 37 °C inkubiert.

Nach Beendigung der Reaktion wurde ein 30-minütiger DNase-Verdau (MEGAshortscript™ Kit (Ambion)) durchgeführt, um die DNA-Matrizen zu entfernen. Die DNase wurde mit Ammonium-Acetat abgestoppt. Um Proteine aus der Lösung zu entfernen, wurde die Probe mit einem Volumen Phenol-Chlorophorm-Isoamylalkohol (25:24:1) vermengt und 5 min bei 12.000 g zentrifugiert. Die obere Phenolphase, welche die RNA enthält, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, Chloroform zugegeben und erneut 5 min bei 12.000 g zentrifugiert. Die obere Phase (Phenol-RNA) wurde wiederum in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 100% Ethanol vermengt. Zur Fällung der RNA wurde das Reaktionsgemisch 2 h bei -20 °C inkubiert. Durch erneutes Zentrifugieren für 30 min bei 14.000g/ 4 °C wurde die RNA pelletiert, der Überstand verworfen und die RNA in RNase-freiem Wasser aufgelöst.

2.2.4. Reporter-gen-Analysen

Für Reporter-gen-Analysen kann die Firefly-Luziferase (Glühwürmchen, *Phausis splendidula*) unter der Kontrolle eines beliebigen Promotors exprimiert werden. Als Transfektionskontrolle kann eine Renilla-Luziferase (Seefeder, *Renilla reniformis*) verwendet werden. Die verwendeten Firefly-Luziferase-Vektoren (Promega) enthielten entweder einen Promotor mit multiplen spezifischen DNA-Bindesequenzen des Transkriptionsfaktors NF- κ B oder den Noxa-Promotorbereich (Wildtyp oder mit Mutationen in bestimmten Bindestellen). Kommt es zur spezifischen Bindung der Transkriptionsfaktoren an diese Sequenzen, wird das gekoppelte Gen, die Firefly Luziferase transkribiert und translatiert. Dabei ist die Menge an produziertem Enzym proportional zur Stärke der Promotoraktivierung. Die Detektion des gebildeten Enzyms erfolgt dann durch Zugabe eines spezifischen Substrats, dem Luziferin. Das Luziferin wird unter Verwendung von ATP zu Oxiluziferin oxidiert, welches luminometrisch detektierbar ist. Um Unterschiede in der Zellzahl oder in der Transfektionseffizienz berücksichtigen zu können, wird der Renilla-Vektor (Promega), unter Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promotors zusammen mit dem Reporterkonstrukt transfiziert. Die Renilla-Luziferase setzt Coelenterazine zu Coelenteramid um, welches unabhängig von Oxiluziferin detektiert wird und zur Normalisierung des Systems dient.

2.2.4.1. Nachweis der transkriptionellen Aktivität von NF- κ B

Das hierfür verwendete Reporterplasmid pGI3-NF κ B-luc enthielt sechs aufeinander folgende DNA-Bindesequenzen an die spezifisch NF- κ B bindet [82]. Für die Bestimmung der transkriptionellen Aktivität von NF- κ B wurden die zu untersuchenden Zelllinien zu 60-70% Konfluenz einen Tag vor dem Versuch in 24-Loch-Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Reporter wie folgt transfiziert: 1,5 μ l FuGENE 6 Transfektionsreagenz wurden in 20 μ l OPTIMEM verdünnt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 500 ng des Firefly-Luciferase-Reporterplasmids und 100 ng des Renilla-Kontrollvektors zugegeben und das Transfektionsgemisch zur Komplexbildung 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Wartezeit wurde das Kulturmedium durch 180 μ l frisches Medium ersetzt und der Transfektionsansatz tröpfchenweise zugegeben. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen, einmal mit HBSS gewaschen und die Zellen mit virusähnlicher RNA stimuliert. Nach 17 h wurden die im Überstand enthaltenen Zellen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß pelletiert (2.600 rpm/ 3 min) und zweimal mit PBS gewaschen. Die adhären Zellen wurden ebenfalls mit PBS gewaschen. Die Zellpellets wurden in 125 μ l Passive Lysis Buffer (Promega) resuspendiert und zurück in die 24-Loch-Platten gegeben. Die im Überstand enthaltenen, sowie die adhären Zellen wurden so bei 4 °C für 10 min aufgeschlossen. Je 25 μ l des Lysats wurden zur Messung der Firefly- und der Renilla-Luziferase Aktivität verwendet. Das Lysat wurde dazu in eine lichtundurchlässige 96-Loch-Zellkulturplatte überführt. Für die Firefly-Luziferase Messung wurden 25 μ l Substrat-Lösung in Form eines 1:1 Gemischs aus Luziferin-Substrat und ATP-Substrat (beide Firma Biothema) zugegeben, für die Renilla-Messung 25 μ l Coelenterazine-Lösung (Promega,

1:800 in H₂O bidest.). Die Messung des emittierten Lichts erfolge sofort nach Zugabe des jeweiligen Substrats.

2.2.4.2. Transkriptionelle Regulation des proapoptotischen Proteins Noxa

Um potentielle Transkriptionsfaktorbindestellen zu identifizieren, die für die Noxa-Regulation nach Stimulation mit virusähnlichen RNAs verantwortlich sind, wurden die pGL3-Noxa-luc-Vektoren verwendet. Ein 1000 bp-Fragment stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle von Noxa wurde in den pGL3 Reportervektor einkloniert (wt-Noxa-luc) und spezifische Transkriptionsfaktorbindestellen innerhalb der Promotorregion mutiert (p53mut-Noxa-luc; IRFmut-Noxa-luc; CREmut-Noxa-luc). Ist eine dieser Bindestellen für die transkriptionelle Regulation von Noxa verantwortlich, resultiert die Mutation der Bindestelle verglichen mit dem Wildtyp-Promotor nach Stimulation mit virusähnlicher RNA in einer geringeren Luciferase-Aktivität. Für den Versuch zur Untersuchung der transkriptionellen Regulation von Noxa wurde wie unter Punkt 2.2.4.1 beschrieben verfahren.

2.2.5. *In-Silicio*-Analysen des Noxa-Promotorbereichs

Um potentielle Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, die nach der Stimulation von Zellen mit virusähnlichen RNAs die Noxa-Induktion steuern können, wurde das Programm MatInspector der Genomatix Software (München, Deutschland) verwendet. Die Funktionsweise der MatInspector Software und die Algorithmen, die ihr zugrunde liegen, wurden von Quandt et al. und Cartharius et al. beschrieben [83, 84]. Die Analysen wurden in Kooperation mit Dr. Martin Irmeler, Helmholtz-Zentrum, München durchgeführt.

2.2.6. Statistische Analysen

Für alle statistischen Untersuchungen in dieser Arbeit wurde die SPSS Software PASW statistics 17 verwendet. Es wurde stets ein t-Test mit unabhängigen Proben durchgeführt. Als signifikant (*) gelten p-Werte $\leq 0,05$. Als nicht signifikant (n.s.) wurden p-Werte $> 0,05$ gewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Analyse der Expression und Funktion antiapoptotischer Bcl-2-Proteine im malignen Melanom und in nicht-malignen Hautzellen

Ein grundsätzliches Ziel der Tumorthherapie stellt die therapeutische Spezifität dar: Es soll malignes Gewebe möglichst vollständig zerstört werden, während gesundes Gewebe wenig geschädigt wird. Ein idealer Therapieansatz ist also eine Substanz, die zielgerichtet Zelltod in Tumorzellen induziert.

In den folgenden Arbeiten wurden die Expression und Funktionalität antiapoptotischer Bcl-2-Proteine im malignen Melanom und nicht-malignen Hautzellen untersucht, um neue therapeutische Angriffspunkte aufzudecken und um Resistenzmechanismen des malignen Melanoms aufzuklären.

3.1.1. Expressionsanalyse antiapoptotischer Bcl-2-Proteine

Einen potentiellen Mechanismus für Tumorzellen Apoptose zu verhindern stellt die Überexpression antiapoptotischer Bcl-2-Proteine dar. Im Folgenden (*Abbildung 7*) wurde die Expression von Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w und Mcl-1 in nicht-malignen Hautzellen (Fibroblasten, Keratinozyten, Melanozyten) auf Proteinebene im Immunoblot analysiert. Anschließend wurde die Expression der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine in weiteren Melanozyten-Spendern untersucht und mit Melanomzelllinien unterschiedlicher Progressionsstufen, und zwar der nicht-invasiven Melanomzelllinie WM3211 (RGP), der invasiven Melanomzelllinie WM793 (VGP) und den vier metastatischen Melanomzelllinien WM1232, WM1158, WM239A und 1205Lu, verglichen. Wegen der geringen Sensitivität der kommerziell erhältlichen A1-Antikörper wurde die Expression von A1 auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR analysiert. Die Analysen ergaben, dass die Expression der Bcl-2-Proteine stark zwischen den verschiedenen Zellarten variiert. Die Expression von Bcl-2 oder A1 ist in Melanozyten im Vergleich zu anderen nicht-malignen Hautzellen (Fibroblasten, Keratinozyten) höher (*Abbildung 7A und 7D*), wohingegen die antiapoptotischen Proteine Bcl-xL und Mcl-1 in Melanozyten niedriger exprimiert sind als in Fibroblasten oder Keratinozyten (*Abbildung 7A*). Jede der untersuchten Zellarten wies ein zelltypspezifisches Expressionsmuster auf. In Melanozyten wurde dieses Muster durch die Analyse von insgesamt 5 Spendern bestätigt (*Abbildung 7A und 7B*). Die weitere Analyse zeigte deutliche Unterschiede zwischen der Expression der antiapoptotischen Proteine in Melanozyten verglichen mit Melanomzelllinien (*Abbildung 7C und 7D*). So ist Bcl-2 in Melanozyten sehr hoch, in den Melanomzelllinien WM3211, WM1158 und 1205Lu jedoch nur schwach exprimiert. Bcl-xL ist in den metastatischen Melanomzelllinien WM239A und 1205Lu gleich stark exprimiert wie in Melanozyten, hingegen scheint es in WM793, WM1232 und WM1158 überexprimiert. Bcl-w ist in den Melanomzelllinien WM3211, WM793 und WM1232 in nur geringen Mengen vorhanden, wobei die Expression in WM239A, WM1158 und 1205Lu unverändert im

Vergleich zu Melanozyten scheint. Das antiapoptotische Protein Mcl-1 ist in allen untersuchten Melanomzelllinien nahezu in gleichem Maße exprimiert. A1 ist in Melanozyten und in den metastatischen Melanomzelllinien WM239A und WM1158 stark exprimiert, jedoch ist die Expression in anderen Melanomzelllinien sehr gering (WM3211, WM793, WM1158 und 1205Lu).

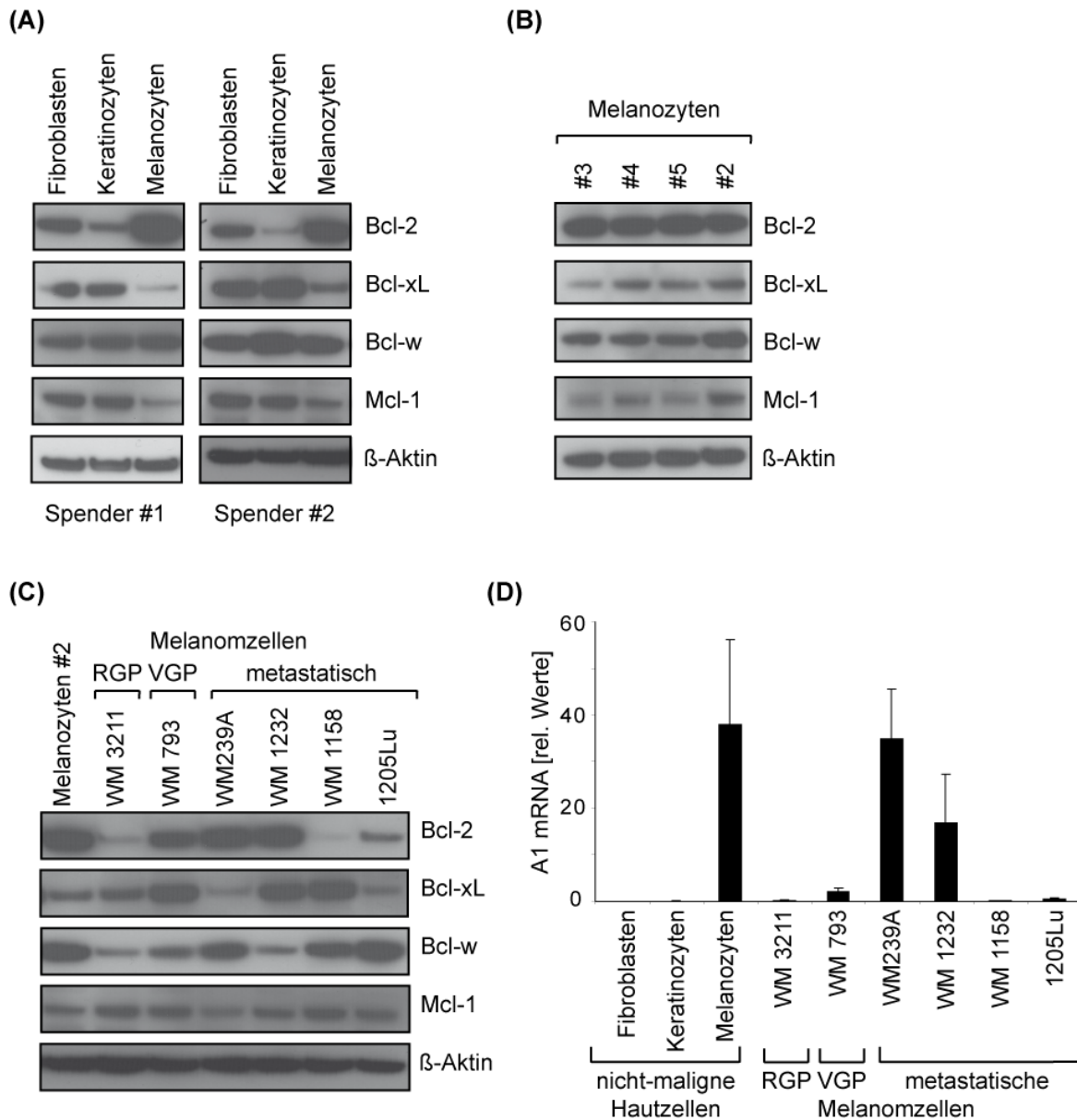


Abbildung 7: Expressionsanalyse antiapoptotischer Bcl-2-Proteine

(A) Die Expression von Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w und Mcl-1 wurde im Immunoblot mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern in Fibroblasten, Keratinozyten und Melanozyten nachgewiesen. Je Zellart wurde das Gesamtprotein von 2 Spendern untersucht.

(B) Die Expression von Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w und Mcl-1 wurde in 3 weiteren Melanozyten-Spendern im Immunoblot untersucht.

(C) Die Expression von Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w und Mcl-1 wurde in Melanomzelllinien unterschiedlicher Progressionsstufen untersucht und mit Melanozyten verglichen. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Der Immunoblot ist repräsentativ für 2 unabhängige Experimente. RGP: *radial growth phase*; VGP: *vertical growth phase*

(D) Die A1-mRNA wurde in nicht-malignen Hautzellen (Fibroblasten, Keratinozyten, Melanozyten) und in Melanomzelllinien unterschiedlicher Progressionsstufen mittels qRT-PCR analysiert. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die Expression antiapoptotischer Bcl-2-Proteine in Melanomzellen verglichen mit ihren gesunden Vorläuferzellen deutlich verändert ist. Allerdings ist kein Trend zur allgemein erhöhten Expression antiapoptotischer Bcl-2-Proteine in Tumorzellen festzustellen. Der Vergleich zwischen nicht-invasiven, invasiven und metastatischen Melanomzelllinien zeigt weiterhin, dass die Expression nicht mit der Tumorprogression assoziiert zu sein scheint.

3.1.2. Untersuchungen zur Funktion der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine

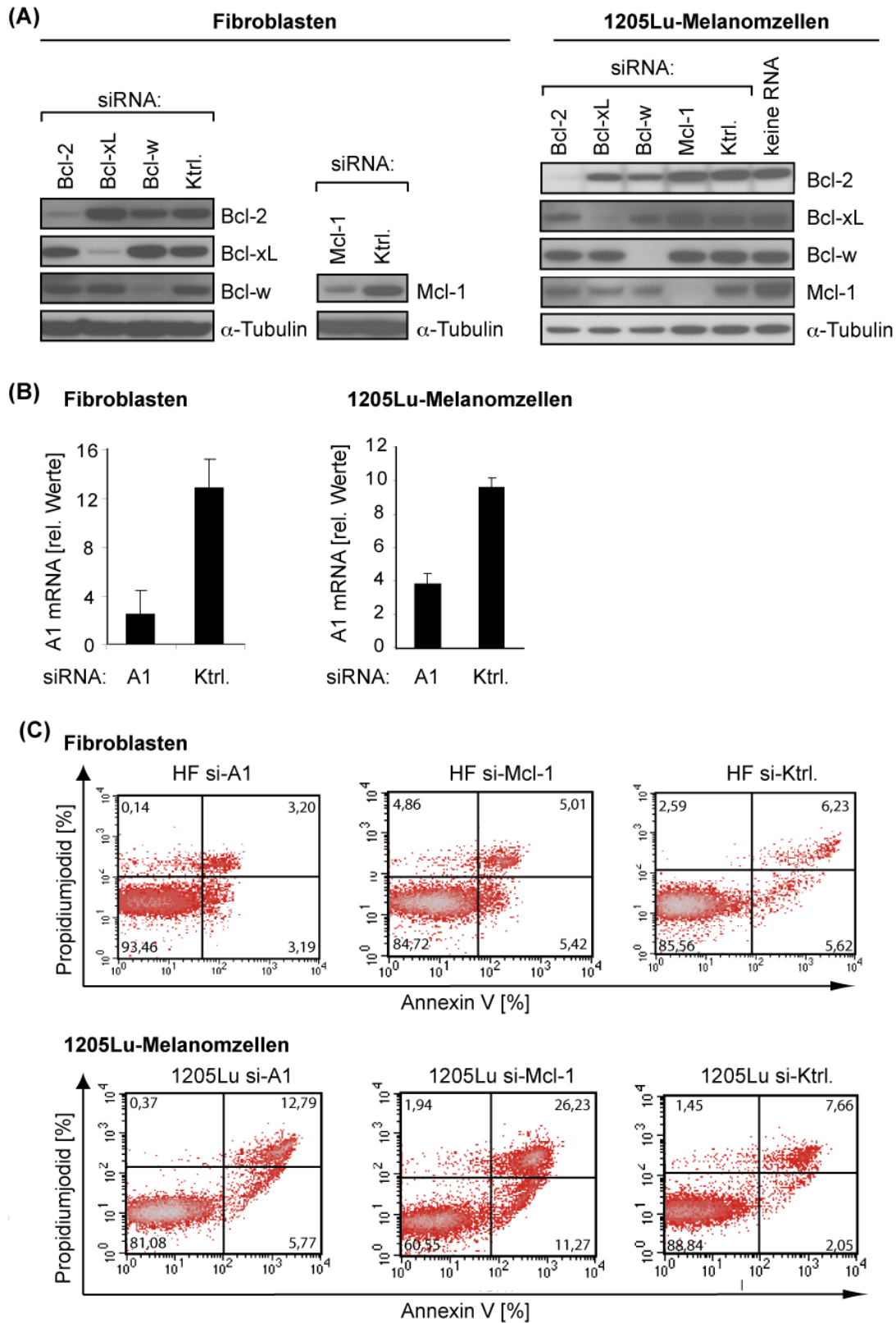
Zur Untersuchung der Funktion antiapoptotischer Bcl-2-Proteine wurde die Technik der RNA-Interferenz angewendet. Mithilfe spezifischer siRNAs kann ein bestimmtes Gen gezielt ausgeschaltet werden, wodurch diese Methode eine sehr hohe Spezifität aufweist.

3.1.2.1. Hemmung einzelner antiapoptotischer Proteine

Um den Einfluss einzelner antiapoptotischer Bcl-2-Proteine auf das Überleben von Melanomzellen und Fibroblasten zu untersuchen, wurden spezifische siRNAs gegen alle bekannten antiapoptotischen Bcl-2-Proteine (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 und A1) entworfen. Mittels Immunoblotanalyse wurde nachgewiesen, dass die Transfektion der siRNAs in humane Fibroblasten und 1205Lu-Melanomzellen die Proteinexpression des jeweiligen Proteins reduziert, ohne die Expression anderer antiapoptotischer Bcl-2-Proteine zu beeinflussen (*Abbildung 8A*). Die Effizienz der A1-spezifischen siRNA wurde mittels qRT-PCR überprüft. Verglichen mit dem Kontrollansatz war die A1-mRNA um 60-80% reduziert (*Abbildung 8B*).

Der Effekt der Hemmung einzelner antiapoptotischer Bcl-2-Proteine auf das Überleben von Fibroblasten oder 1205Lu-Melanomzellen wurde 72 h nach Transfektion der jeweiligen siRNA durch die Analyse der Zelltodinduktion bestimmt. Die Zellen wurden mit FITC-gekoppeltem Annexin V und Propidiumjodid inkubiert und der Anteil gefärbter Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. In *Abbildung 8C* sind repräsentative Punkt-Histogramme (dot blots) der Analyse von Fibroblasten (oben) und 1205Lu-Melanomzellen (unten) gezeigt, die mit der A1-, der Mcl-1-spezifischen oder der Kontroll-siRNA behandelt wurden. Annexin V- und Propidiumjodid-negative Zellen (Quadrant links unten) entsprechen gesunden Zellen. Die Summe der Zellen innerhalb der restlichen drei Quadranten bezeichnet Annexin V- und/oder Propidiumjodid- positive Zellen, also sich in der Apoptose befindende oder bereits tote Zellen.

Die Experimente ergaben, dass die Hemmung von Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 und A1 keine Apoptose in primären humanen Fibroblasten induziert (*Abbildung 8D* links). In Melanomzellen dagegen führte die Hemmung von Mcl-1 (40% apoptotische und tote Zellen) und A1 (30% apoptotische und tote Zellen) zum signifikanten Anstieg des Zelltodes (*Abbildung 8D* rechts).



Fortsetzung nächste Seite

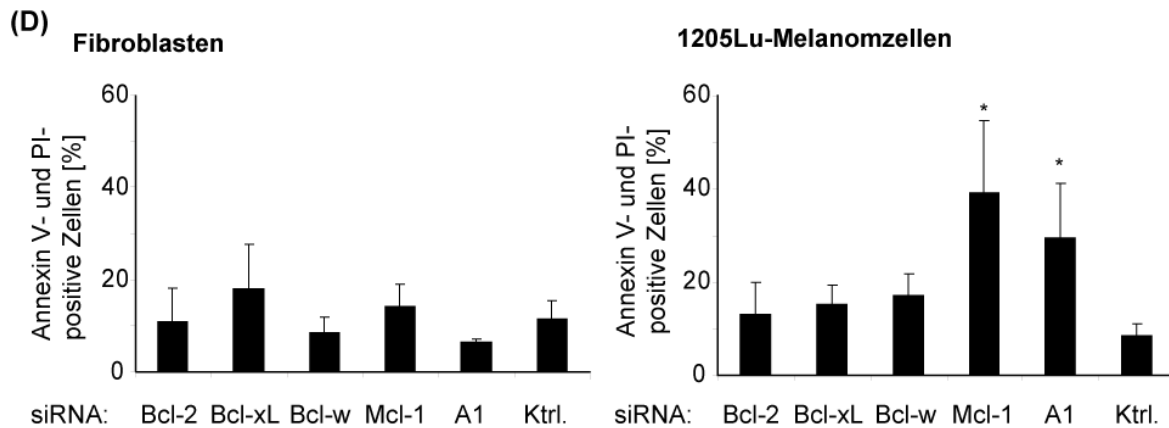


Abbildung 8: Hemmung einzelner antiapoptotischer Bcl-2 Proteine mittels RNA-Interferenz

(A) Humane Fibroblasten (links) und 1205Lu-Melanomzellen (rechts) wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert (beschrieben unter Punkt 2.2.1.3.1.) und nach 48 h analysiert. Gesamtzellprotein wurde im Immunoblot mit spezifischen Antikörpern gegen Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w und Mcl-1 untersucht. Die dargestellten Immunoblots sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

(B) Die A1-mRNA wurde 48 h nach Transfektion der angegebenen siRNAs in Fibroblasten (links) und 1205Lu-Melanomzellen (rechts) mittels qRT-PCR analysiert. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten.

(C) Fibroblasten (oben) und 1205Lu-Melanomzellen (unten) wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert. Nach 72 h wurden die Zellen mit Annexin V und Propidiumjodid gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Zahlen in jedem Quadranten beziffern den Anteil Annexin V und Propidiumjodid positiver beziehungsweise negativer Zellen. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Punkt-Histogramm von 3 unabhängigen Experimenten.

(D) Fibroblasten (links) und 1205Lu-Melanomzellen (rechts) wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert und nach 72 h wurde die Apoptoserate mittels Annexin V- und Propidiumjodid-Färbung analysiert. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten. * bezeichnet eine signifikante Apoptoseinduktion gegenüber der Kontrolle.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass bereits die alleinige Hemmung der antiapoptotischen Proteine Mcl-1 oder A1 in Melanomzellen zum Zelltod führt, während das Überleben von Fibroblasten nach der Ausschaltung einzelner antiapoptotischer Proteine unbeeinflusst bleibt.

3.1.2.2. Gleichzeitiges Angreifen mehrerer antiapoptotischer Bcl-2-Proteine

Bisher wurde beobachtet, dass es möglich ist, über die Hemmung bestimmter antiapoptotischer Bcl-2-Proteine tumorspezifisch Zelltod zu induzieren. In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob die Apoptose durch das gleichzeitige Angreifen mehrerer antiapoptotischer Proteine weiter gesteigert werden kann. Hierzu wurde zunächst die chemische Substanz ABT-737 verwendet. ABT-737 interagiert, so wie das BH3-only-Protein Bad, mit spezifischen antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen (*Abbildung 9A*). Es ist ein potenter Inhibitor von Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w, da es hohe Bindungsaffinitäten gegenüber Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w aufweist, aber nicht mit Mcl-1 und A1 interagiert [73]. Durch die Interaktion können die antiapoptotischen Proteine die proapoptotischen Effektormoleküle Bax und Bak nicht mehr hemmen und ihre antiapoptotische Funktion wird so verhindert. Eine direkte Aktivierung der Effektorproteine Bax und Bak durch ABT-737 findet nicht statt.

Es wurde untersucht, ob die Inhibition von Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w mittels ABT-737 das Überleben von Fibroblasten und Melanomzellen beeinflusst. Hierzu wurden 1205Lu-Melanomzellen und primäre humane Fibroblasten mit ABT-737 behandelt. Da ABT-737 nicht mit Mcl-1 oder A1 interagiert, wurden diese Proteine zusätzlich mittels siRNA gehemmt und die Apoptoserate analysiert.

Abbildung 9B (links) zeigt, dass die Behandlung von Melanomzellen mit ABT-737 keinen schädigenden Effekt hat und Apoptose nicht signifikant induziert wird. Wurde dagegen zusätzlich A1 mittels RNA-Interferenz gehemmt, wurde die Apoptose auf 50% gesteigert. Die

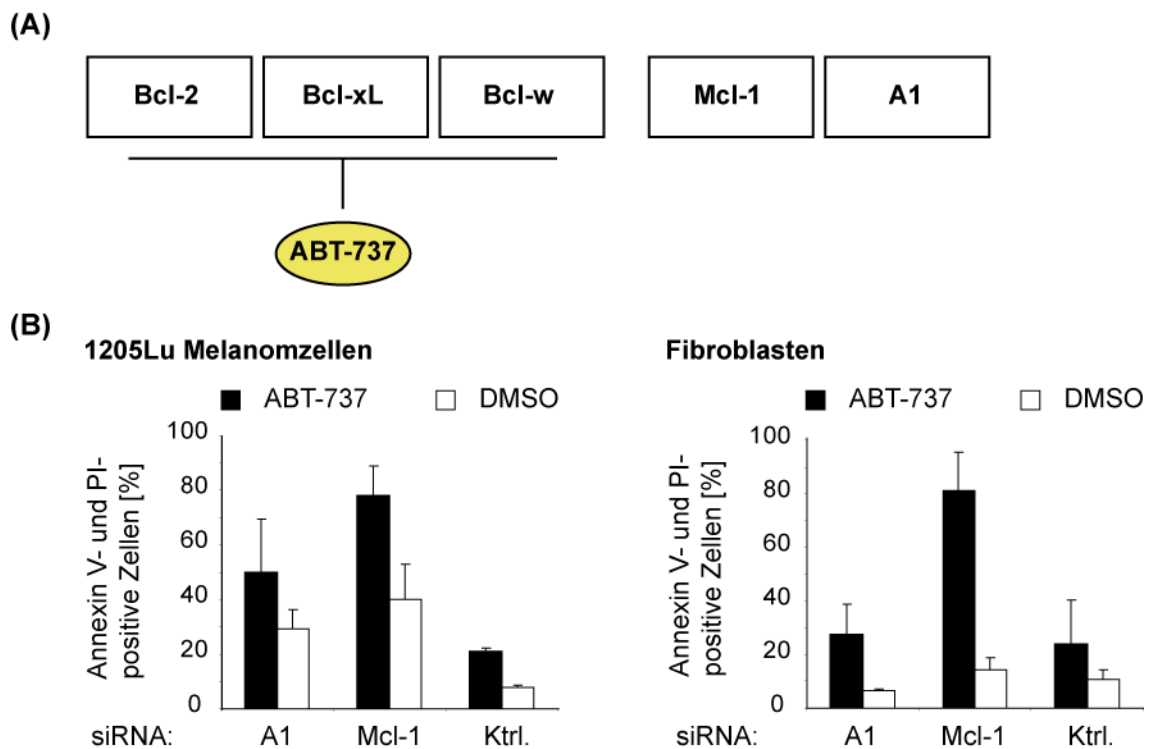


Abbildung 9: Gleichzeitige Hemmung mehrerer antiapoptotischer Proteine durch ABT-737

(A) Schematische Darstellung des Wirkmechanismus von ABT-737: Der niedermolekulare Wirkstoff ABT-737 bindet mit hoher Affinität Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w, wodurch deren antiapoptotische Funktion gehemmt wird. ABT-737 interagiert nicht mit Mcl-1 oder A1.

(B) 1205Lu-Melanomzellen (links) und primäre humane Fibroblasten (rechts) wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert und nach 48 h wurden die Zellen mit 1 μ M ABT-737 behandelt. Die Zelltodrate wurde nach weiteren 24 h Inkubation analysiert. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten.

zusätzliche Hemmung von Mcl-1 führte zu einer massiven Apoptoseinduktion (80% apoptotische und tote Zellen). Diese Daten lassen vermuten, dass die Kombination der Mcl-1-Hemmung und ABT-737 Behandlung eine neue Strategie sein kann, um das maligne Melanom zu behandeln. Weitere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass diese Behandlung auch nicht-maligne Hautzellen schädigt: Primäre humane Fibroblasten (Abbildung 9B rechts) wurden mit ABT-737 allein oder in Kombination mit den A1- oder Mcl-1-spezifischen siRNAs behandelt. Die Apoptose war auch hier durch die Kombination mit der

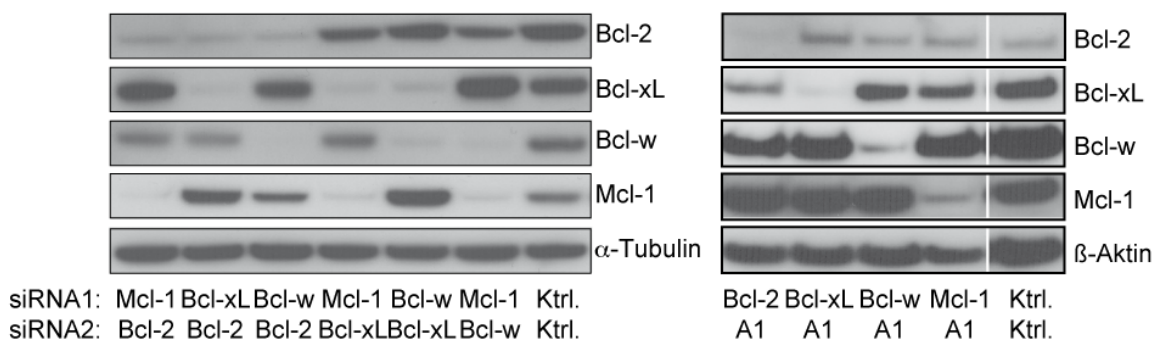
Mcl-1-siRNA stark induziert (80% apoptotische und tote Zellen), während die alleinige Behandlung mit ABT-737 wenig Einfluss auf das Überleben der Fibroblasten hatte (25% apoptotische und tote Zellen). Die A1-siRNA steigerte die ABT-737 induzierte Apoptose nicht weiter. Obwohl die Kombination der beiden Behandlungen sehr effizient Zelltod auslöste, konnte daher keine tumorspezifische Wirkung erzielt werden.

3.1.2.3. Kombinierte Hemmung zweier antiapoptotischer Bcl-2-Proteine

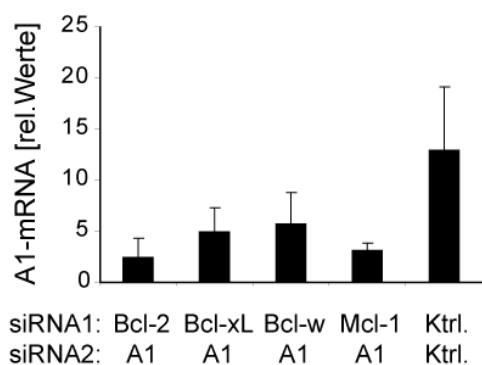
Da beobachtet wurde, dass Melanomzellen sensitiv auf den Verlust einzelner antiapoptotischer Bcl-2-Proteine sind, und die Apoptose steigerbar durch die chemische Substanz ABT-737 war, wurde in einem nächsten Schritt untersucht, ob die Apoptoserate durch ein gezieltes Angreifen tumorspezifisch gesteigert werden kann. Zu diesem Zweck wurden zwei antiapoptotische Bcl-2-Proteine gleichzeitig mittels RNAi gehemmt. Die Effekte in Melanomzellen wurden mit denen in primären humanen Fibroblasten verglichen, um die Tumorspezifität des Ansatzes zu überprüfen.

Zunächst wurde die Effizienz der kombinierten Hemmung in Fibroblasten im Immunoblot untersucht (*Abbildung 10A*). In allen Kombinationen führte die siRNA-Behandlung zu einer sehr deutlichen Reduktion der jeweiligen Proteinexpression, ohne die Expression anderer antiapoptotischer Bcl-2-Proteine zu beeinflussen. Die Effizienz der A1-spezifischen siRNA wurde mittels qRT-PCR analysiert und ist in *Abbildung 10B* grafisch dargestellt.

(A)



(B)



Fortsetzung nächste Seite

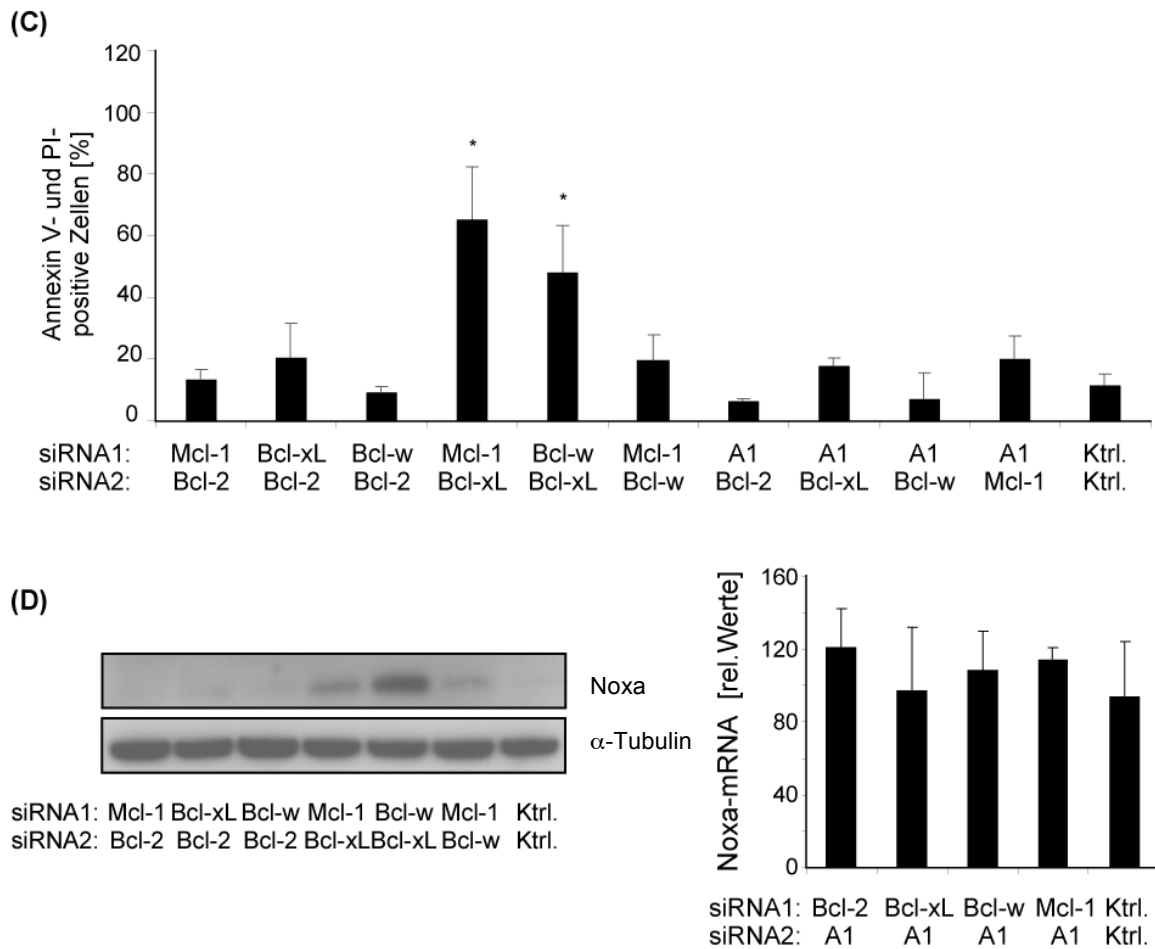


Abbildung 10: Gleichzeitige Hemmung zweier antiapoptotischer Proteine mittels RNA-Interferenz

(A) Fibroblasten wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert und nach 48 h analysiert. Gesamtzellprotein wurde im Immunoblot mit spezifischen Antikörpern gegen Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w und Mcl-1 untersucht. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot von 3 unabhängigen Experimenten.

(B) Die A1 mRNA wurde nach Transfektion der angezeigten siRNAs mittels qRT-PCR analysiert. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten.

(C) Fibroblasten (links) wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert. Nach 72 h wurde die Apoptoserate mittels Annexin V- und Propidiumjodid-Färbung analysiert. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten. * bezeichnet eine signifikante Apoptoseinduktion gegenüber der Kontrolle.

(D) Fibroblasten wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert und nach 48 h wurde Gesamtzellprotein und mRNA extrahiert. Noxa Protein wurde im Immunoblot (links) mittels eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Gezeigt ist ein repräsentativer Immunoblot für 2 unabhängige Experimente. Noxa-mRNA (rechts) wurde mittels qRT-PCR analysiert. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten.

Die Apoptoserate wurde 72 h nach Transfektion der siRNAs analysiert (*Abbildung 10C*). Die gleichzeitige Hemmung von Bcl-xL und Mcl-1 sowie von Bcl-xL und Bcl-w führte in humanen Fibroblasten zu einer signifikanten Zelltodinduktion. Alle weiteren Kombinationen erzielten keinen signifikanten Effekt. Die Analyse des proapoptotischen BH3-only Proteins Noxa auf Proteinebene (*Abbildung 10D links*) und auf mRNA-Ebene (*Abbildung 10D rechts*) zeigte, dass Noxa durch die gleichzeitige Transfektion mit Bcl-xL- und Bcl-w-siRNA induziert wurde, wobei die Ko-Transfektion anderer siRNAs keinen erheblichen Einfluss auf die Noxa-Expression hatte. Noxa ist ein endogener Inhibitor von Mcl-1 und A1 [85]. Demnach werden durch die spezifischen siRNAs nicht nur die Zielgene Bcl-w und Bcl-xL gehemmt, sondern

auch, bedingt durch die Noxa-Induktion, Mcl-1 und A1. Die Induktion des Zelltodes ist demnach nicht ausschließlich auf die Hemmung von Bcl-w mit Bcl-xL zurückzuführen.

In einem nächsten Schritt wurde das gleiche Experiment in 1205Lu-Melanomzellen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in *Abbildung 11* im Vergleich mit Fibroblasten grafisch dargestellt. Im Gegensatz zu Fibroblasten konnte in Melanomzellen durch mehrere kombinierte Hemmungen eine erhöhte Apoptose ausgelöst werden. Da die Hemmung von Mcl-1 allein in Melanomzellen Apoptose induziert, war auch bei allen Kombinationen mit der Mcl-1-siRNA der Zelltod erhöht. Während in Kontrollzellen 8% Apoptose beobachtet wurde, führten die Hemmungen von Mcl-1/Bcl-2 zu 48%, Mcl-1/Bcl-xL zu 84%, Mcl-1/Bcl-w zu 54% und A1/Mcl-1 zu 62% apoptotischen beziehungsweise toten Zellen. Weiterhin führten die Kombinationen A1/Bcl-2 in 34% und A1/Bcl-w in 29% zum Zelltod. Auch die gleichzeitige Hemmung von Bcl-2/Bcl-w und von Bcl-w/Bcl-xL führte in Melanomzellen zu einer signifikanten Erhöhung apoptotischer und toter Zellen.

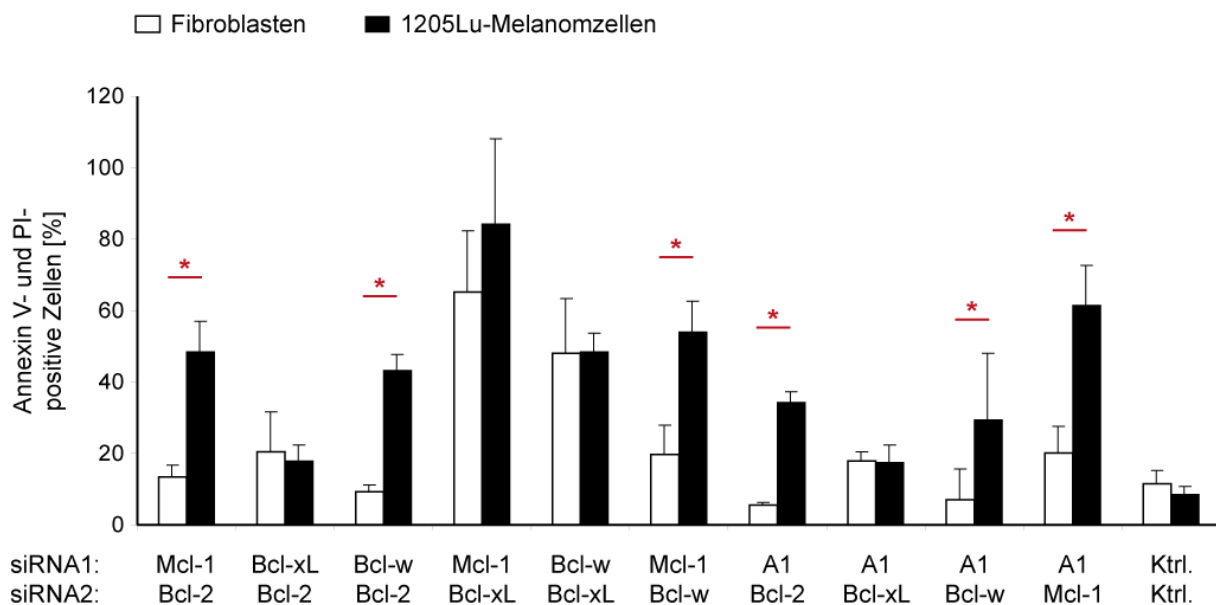


Abbildung 11: Vergleich der Apoptoseinduktion in Melanomzellen und Fibroblasten bei gleichzeitiger Hemmung zweier antiapoptotischer Bcl-2 Proteine

1205Lu-Melanomzellen (schwarze Balken) wurden wie Fibroblasten (graue Balken) mit den angegebenen siRNAs behandelt und nach 72 h wurde Apoptose gemessen. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten. * repräsentiert einen signifikanten Unterschied der Apoptoseinduktion zwischen Fibroblasten und Melanomzellen bei gleicher Behandlung.

Von besonderem Interesse sind die Kombinationen, bei welchen Zelltod in Tumorzellen ausgelöst wird, nicht aber in nicht-malignen Zellen. Eine signifikant höhere Apoptoseinduktion in Melanomzellen im Vergleich zu Fibroblasten wurde durch die gleichzeitige Hemmung von Mcl-1/Bcl-2, Bcl-w/Bcl-2, Mcl-1/Bcl-w, A1/Bcl-2, A1/Bcl-w und A1/Mcl-1 ausgelöst. Mit Ausnahme von der Kombination Bcl-w/Bcl-2 sind in allen

Kombinationen entweder Mcl-1 oder A1 enthalten, durch deren alleinige Hemmung in Melanomzellen bereits Apoptose induziert werden kann. Die höchste tumorspezifische Zelltodinduktion wurde bei der gleichzeitigen Hemmung von Mcl-1 und A1 beobachtet.

Zusammengefasst lässt diese Analyse folgende Rückschlüsse zu: 1) Für die Zelltodinduktion in Fibroblasten müssen mindestens zwei antiapoptotische Proteine gehemmt werden. 2) Die antiapoptotischen Proteine Mcl-1 und Bcl-xL scheinen von besonderer Bedeutung für das Überleben von malignen und nicht-malignen Zellen, da deren Inhibition in Fibroblasten und Melanomzellen zu einer stark erhöhten Zelltodrate (65% bzw. 85%) führte. Die Hemmung von Bcl-xL/Bcl-w scheint über die einhergehende Noxa-Induktion zu Apoptose zu führen. 3) Melanomzellen reagieren sensibler auf den Verlust antiapoptotischer Proteine. 4) Von besonderer Bedeutung für das Überleben von Melanomzellen sind die antiapoptotischen Proteine Mcl-1 und A1.

3.1.2.4. Tumorspezifische Zelltodinduktion durch die kombinierte Hemmung von A1 und Mcl-1

In 1205Lu-Melanomzellen wurde durch die Hemmung von Mcl-1 zusammen mit A1 effizient Apoptose induziert, primäre humane Fibroblasten dagegen überlebten. In weiterführenden Experimenten wurden diese Beobachtungen an weiteren Melanomzelllinien verschiedener Progressionsstufen und primären Hautzellen (Keratinocyten) überprüft (*Abbildung 12*). Da die Transfektionseffizienz von Melanozyten sehr gering ist und nur schwache Hemmeffizienzen erreicht wurden, wurden diese nicht in die siRNA-Experimente eingeschlossen.

Wie auch in Fibroblasten führte weder die alleinige Hemmung von A1 oder Mcl-1 noch die kombinierte Hemmung von A1 und Mcl-1 in primären Keratinocyten zur Zelltodinduktion (*Abbildung 12A*).

Werden A1 und/oder Mcl-1 in der nicht-invasiven Melanomzelllinie WM3211 und der invasiven Melanomzelllinie WM793 gehemmt, ist zu beobachten, dass die A1-siRNA in beiden Zelllinien keinen apoptotischen Effekt zeigt und die Mcl-1-siRNA nur in WM3211 zur signifikanten Zelltodinduktion führt. Hingegen resultiert die Hemmung von Mcl-1 zusammen mit A1 in beiden Zelllinien in einer effizienten Zelltodinduktion von 82% beziehungsweise 65% (*Abbildung 12B*). Zusätzlich zur 1205Lu-Zelllinie wurden noch drei weitere metastatische Melanomzelllinien (WM1232, WM239A, WM1158) untersucht. Die Hemmung von A1 führte nur in WM239A und WM1158 zu einer gesteigerten Zelltodinduktion. Die Transfektion mit der Mcl-1-siRNA resultierte in WM1158 und WM1232 in einer gesteigerten Apoptoserate. Durch die gleichzeitige Hemmung von Mcl-1 und A1 wurde dagegen in allen untersuchten metastatischen Melanomzellen effizient Apoptose induziert (apoptotisch und tote Zellen in WM1232=55%, in WM239A=79%, in WM1158=88%) (*Abbildung 12C*).

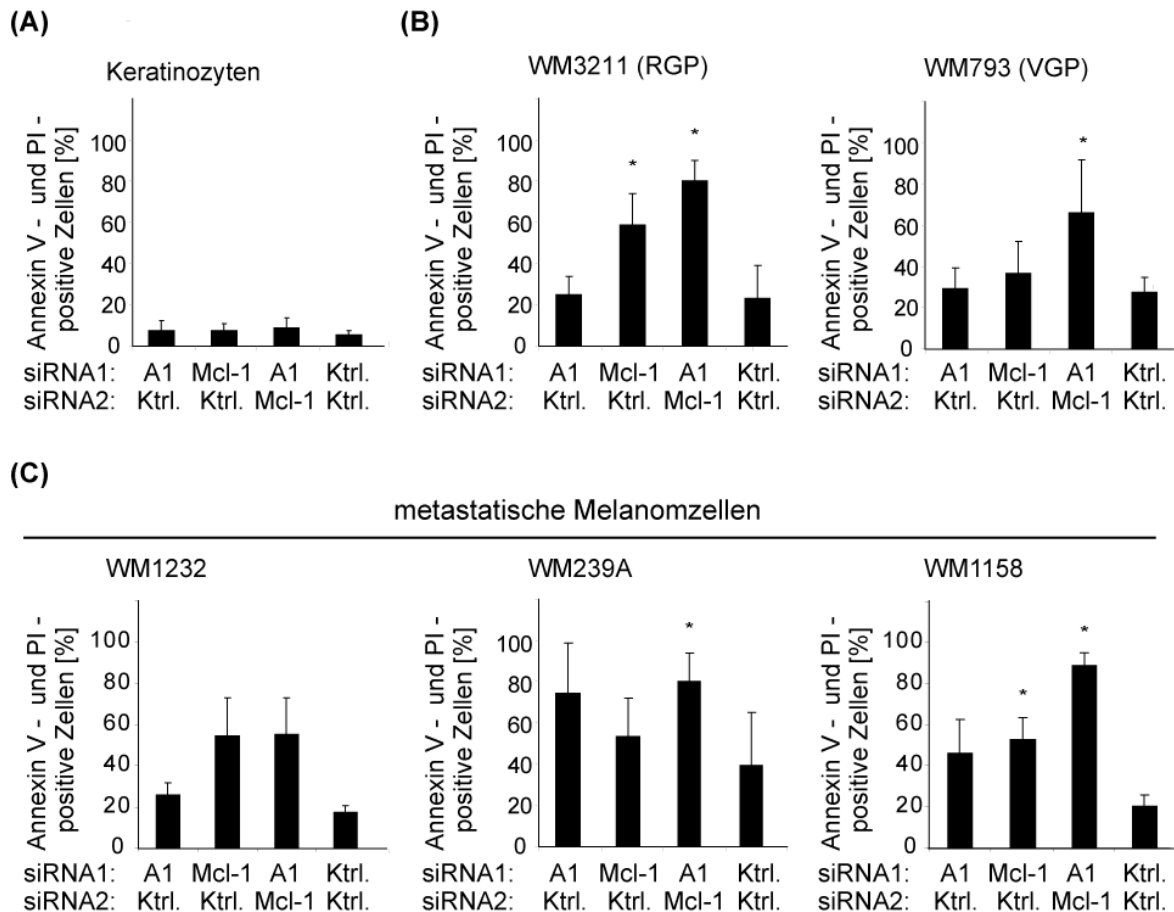


Abbildung 12: Die gleichzeitige Hemmung von A1 und Mcl-1 führt zur tumorspezifischen Apoptoseinduktion

(A) Nicht-maligne Hautzellen (Keratinozyten), sowie (B) nicht-invasive und invasive Melanomzelllinien (WM3211 und WM793) und (C) metastatische Melanomzelllinien (WM1232, WM239A und WM1158) wurden mit den angegebenen siRNAs behandelt und nach 72 h die Apoptoseinduktion erhoben. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von 3, beziehungsweise im Fall von WM3211 und WM793 von 5 unabhängigen Experimenten. * bezeichnet eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate gegenüber der Kontrollbehandlung. RGP: *radial growth phase*; VGP: *vertical growth phase*

Diese Daten bestätigen die Beobachtungen, dass eine tumorspezifische Apoptoseinduktion durch die gleichzeitige Hemmung der antiapoptotischen Proteine Mcl-1 und A1 möglich ist. In allen getesteten nicht-malignen Hautzellen waren diese antiapoptotischen Proteine für das Überleben entbehrlich, wohingegen alle untersuchten Melanomzelllinien auf die Expression dieser Proteine angewiesen waren. Die kombinierte Hemmung von Mcl-1 und A1 erzielte meist eine höhere Apoptoserate als die Hemmung der einzelnen Proteine und war in allen getesteten Melanomzellen effektiv. So konnten Mcl-1 und A1 als therapeutische Angriffspunkte für eine melanomspezifische Zelltodinduktion identifiziert werden.

3.1.3. Die Inhibition von Mcl-1 und A1 in Kombination mit weiteren therapeutischen Ansätzen

Durch die zielgerichtete Hemmung einzelner antiapoptotischer Proteine kann nicht nur die Apoptose direkt eingeleitet werden, sondern es könnte auch das Ansprechen der Tumorzellen auf andere therapeutische Ansätze verbessert werden. Störungen im mitochondrialen Apoptoseweg, die beispielsweise in der Überexpression antiapoptotischer Bcl-2-Proteine oder in einer mangelnden Aktivierung der proapoptotischen Signalübermittler münden, sind oft für die Therapieresistenz verantwortlich. Da die Proteine A1 und Mcl-1 von besonderer Bedeutung für das Überleben von Melanomzellen sind, wurde untersucht, ob die Hemmung dieser Proteine Melanomzellen für die Therapie zugänglicher machen oder der tumorspezifische Zelltod noch weiter verstärkt werden kann.

3.1.3.1. Die Kombination der A1-Hemmung und ABT-737

Zuerst wurde untersucht, ob die Hemmung von A1 Melanomzellen für die Behandlung mit ABT-737 sensibilisiert. Die alleinige Behandlung von 1205Lu-Melanomzellen und Fibroblasten mit ABT-737 zeigte keinen Einfluss auf das Überleben dieser Zellen. Die siRNA-vermittelte Hemmung von Mcl-1 sensibilisierte für die Behandlung (*Abbildung 9B*), eine tumorspezifische Zelltodinduktion wurde aber nicht erzielt. Eine Steigerung der Apoptose wurde auch durch die kombinierte Behandlung von ABT-737 zusammen mit der A1-Hemmung beobachtet (50% apoptotische und tote Zellen im Vergleich zu den Einzelbehandlungen: 21% durch ABT-737 und 33% durch A1-siRNA), während in Fibroblasten kein steigender Effekt zu beobachten war (*Abbildung 9B*).

Um eine mögliche Sensibilisierung für ABT-737 durch die A1-Hemmung zu untersuchen, wurden die Effekte in zwei weiteren Melanomzelllinien analysiert (*Abbildung 13*). Es wurden Zelllinien mit geringer A1-Expression (WM3211) und hoher A1-Expression (WM239A)

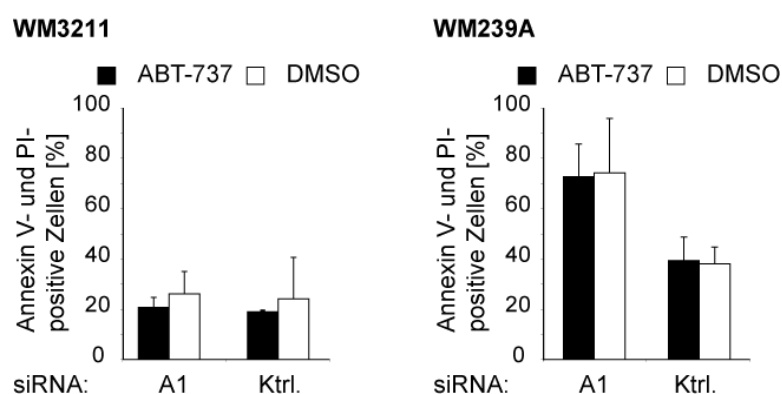


Abbildung 13: Hemmung von A1 in Kombination mit der chemischen Substanz ABT-737.

Die Melanomzelllinien WM3211 und WM239A wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 1 μ M ABT-737 oder zur Kontrolle mit 1 μ l Lösungsmittel (DMSO) behandelt und nach weiteren 24 h der Anteil Annexin V- und Propidiumjodid- positiver Zellen bestimmt. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten.

verwendet. In beiden Zelllinien wurde durch die kombinierte Behandlung die Apoptose nicht weiter gesteigert. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die siRNA-vermittelte Hemmung von A1 kombiniert mit der Exposition gegenüber ABT-737 nicht zu einer verstärkten tumorspezifischen Zelltodinduktion führt.

3.1.3.2. Die Hemmung von A1 und Mcl-1 in Kombination mit Zytostatika

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob die tumorspezifische Apoptose, induziert durch A1- und Mcl-1-Hemmung durch die chemotherapeutische Substanz 5-Fluorouracil (5-FU) weiter verstärkt werden kann. 5-FU zählt zur Gruppe der Antimetabolite. Es ist ein Pyrimidinanalogon das anstelle von Thymidin/Uracil in die DNA beziehungsweise RNA eingebaut wird. Dies führt zu Einzelstrangbrüchen in der DNA und zur Hemmung der Proteinbiosynthese [86].

Zunächst wurde die Zellvitalität von 1205Lu-Melanomzellen und Fibroblasten untersucht, die über 6 Tage mit der A1-, der Mcl-1- oder beiden siRNAs behandelt wurden und zusätzlich mit 5-FU exponiert wurden (*Abbildung 14A*). Die alleinige Exposition gegenüber 5-FU reduzierte die Zellvitalität von 1205Lu-Melanomzellen gering, die Hemmung von A1 führte zu einer Reduktion auf 60%, die Hemmung von Mcl-1 auf 30% und die kombinierte Hemmung von Mcl-1 und A1 führte zu einer Reduktion der Zellvitalität auf 20%. Durch die zusätzliche Gabe von 5-FU wurde die Zellvitalität in Mcl-1-gehemmten Zellen weiter auf etwa 15% und in Mcl-1/A1-gehemmten Zellen auf 10% gesenkt. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass 50% der Zellen, welche die A1/Mcl-1-Hemmung überleben, durch die zusätzliche Gabe von 5-FU angegriffen werden können. In Fibroblasten hingegen wurde die Zellvitalität weder durch die alleinige Exposition gegenüber 5-FU oder die Hemmung von Mcl-1 und A1, noch durch die Kombination der Ansätze reduziert.

Als nächstes wurde die Apoptoseinduktion 6 Tage nach der siRNA- und 5-FU-Behandlung analysiert. Trotz einer starken Reduktion der Zellvitalität war zu diesem Zeitpunkt keine Apoptose in A1- und Mcl-1-gehemmten 1205Lu-Melanomzellen messbar (*Abbildung 14B links*). Demzufolge wird eine kleine Subpopulation nicht durch die Hemmung der antiapoptotischen Proteine angegriffen. Jedoch war die Apoptose durch zusätzliche Gabe von 5-FU in dieser überlebenden Population stark erhöht (etwa 60% apoptotisch und tote Zellen). In Fibroblasten war durch keine Behandlung Apoptose induziert (*Abbildung 14B rechts*).

In *Abbildung 14 C und D* sind lichtmikroskopische Aufnahmen 6 Tage nach der Behandlung gezeigt, die diese Situation widerspiegeln. Die Hemmung von A1, Mcl-1 oder beiden Proteinen gleichzeitig induziert Apoptose und resultiert in einer Verringerung der Zellzahl gegenüber der Kontrollbehandlung (*Abbildung 14C obere Reihe*). Am Tag 6 ist die Apoptose in diesen Zellen nicht mehr zu beobachten und einige Zellen überleben die Behandlung. Durch zusätzliche Gabe von 5-FU wird diese überlebende Population angegriffen und die Zellzahl halbiert sich, wodurch ein nahezu vollständiges Absterben der Zellen zu beobachten ist. Im Gegensatz hierzu zeigt sich keine Veränderung in Fibroblasten (*Abbildung 14D*). Die Morphologie und Anzahl der Zellen bleibt durch alle Behandlungen unverändert.

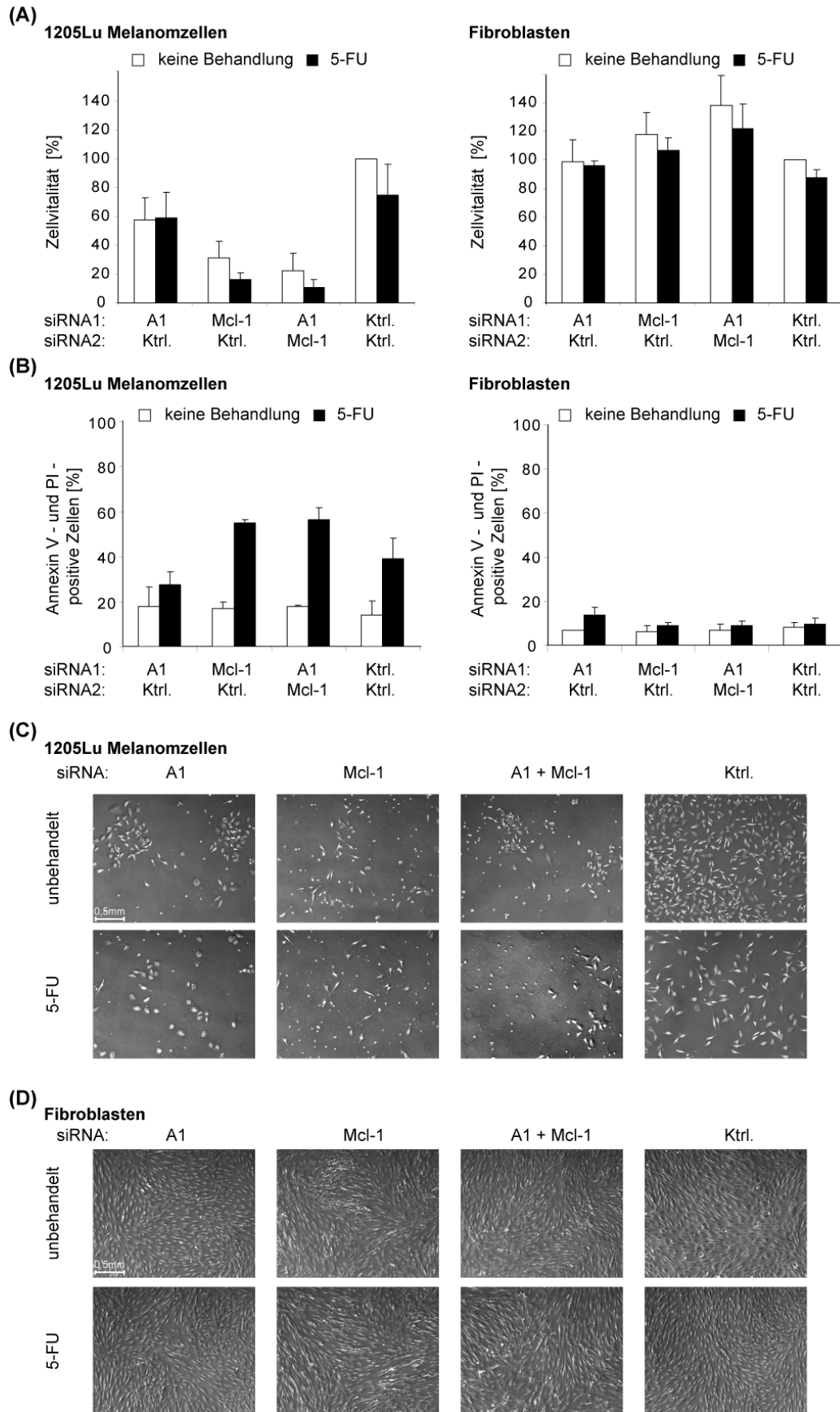


Abbildung 14: Hemmung von A1 und Mcl-1 in Kombination mit 5-FU

(A) 1205Lu Melanomzellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert und mit 1 μ M 5-Fluorouracil (5-FU) behandelt. Nach sechs Tagen wurde die Zellvitalität mittels CellTiterBlue-Reagenz bestimmt. Unbehandelte Zellen wurden gleich 100% gesetzt. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten.

(B) 1205Lu-Melanomzellen (links) und Fibroblasten (rechts) wurden wie in (A) beschrieben behandelt. Nach 6 Tagen wurde der Anteil Annexin V- und Propidiumjodid- positiver Zellen bestimmt. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten.

(C) Lichtmikroskopische Aufnahmen von 1205Lu-Melanomzellen und (D) Fibroblasten 6 Tage nach Behandlung wie in (A) beschrieben. Obere Reihe: nur siRNA behandelte Zellen, untere Reihe: zusätzlich mit 1 μ M 5-FU behandelt. Vergrößerung: 50-fach; der Maßstabsbalken entspricht 0,5 mm.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die gezielte Hemmung von antiapoptotischen Proteinen wie Mcl-1 und A1 synergistisch mit bestimmten chemotherapeutischen Ansätzen wirkt und dass dabei die tumorspezifische Eigenschaft erhalten bleibt.

3.2. Die Aktivierung des proapoptotischen Proteins Noxa führt zur tumorspezifischen Zelltodinduktion

Die Hemmung von Mcl-1 und A1 erwies sich als eine geeignete Strategie, um spezifisch in Melanomzellen Apoptose auszulösen. Physiologischer Inhibitor ist das proapoptotische Protein Noxa, das spezifisch mit A1 und Mcl-1 interagiert und so deren Aktivität hemmt. Ein aussichtsreicher Ansatzpunkt ist es daher Stoffe einzusetzen, die Noxa aktivieren können.

Noxa kann durch eine Vielzahl apoptotischer Stimuli aktiviert werden. Unter anderem gibt es Hinweise, dass die Infektion einer Zelle mit Viren zur Noxa-abhängigen Zelltodinduktion führt [75]. Bei einer viralen Infektion wird das genetische Material des Virus in die Zelle eingeschleust. Nukleinsäuren stellen eine wichtige Erkennungsstruktur dar, die durch spezialisierte Rezeptoren, den sogenannten *Pattern Recognition Rezeptoren* (PRR), erkannt werden. Zu den PRRs zählen neben den *Toll-like* Rezeptoren (TLR) auch die zytosolischen Helikasen RIG-I und MDA-5, welche doppelsträngige virale RNA im Zytoplasma erkennen und binden. Durch die Bindung der RNA werden die CARD-Domänen der Helikasen freigelegt, über welche sie mit dem mitochondrialen Adapterprotein IPS-1 interagieren können. Diese Interaktion führt zur Aktivierung nachgeschalteter Kinasen, welche Transkriptionsfaktoren der IRF- und NF- κ B-Familie aktivieren. Die Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren resultiert in der Induktion von Typ-I-Interferonen und anderen proinflammatorischen Zytokinen, wodurch eine antivirale Immunantwort ausgelöst wird [87]. Zur Simulation einer Virusinfektion wurden strukturähnliche Liganden in das Zytoplasma einer Zelle eingebracht. Als Liganden für RIG-I wurden kurze 5'-triphosphatkonjugierte RNAs (pppRNA) identifiziert [88, 89]. Diese werden vom Virus direkt in die Zelle eingebracht, durch die virale RNA-Polymerase gebildet und als körperfremd identifiziert, da körpereigene RNAs beim Export aus dem Nukleus mit der CAP-Struktur versehen werden und sich so von viralen RNAs unterscheiden. Kurze 5'-triphosphatkonjugierte RNAs können auch synthetisch durch *In-Vitro*-Transkription (IVT) produziert werden. Im Gegensatz zu RIG-I erkennt MDA-5 überwiegend lange doppelsträngige RNAs wie sie bei der Replikation der Viren entstehen.

Das synthetisch hergestellte RNA-Polymer poly(I:C) ist als starker Aktivator von MDA-5 identifiziert worden [90]. Die Transfektion dieser Liganden, pppRNA und poly(I:C), in Zellen führt zur Aktivierung der zytosolischen Rezeptoren und löst eine ähnliche antivirale Antwort aus, wie auch bei einer Virusinfektion.

3.2.1. Tumorspezifische Zelltodinduktion durch virusähnliche RNAs

Die beiden synthetischen RNAs, pppRNA und poly(I:C), wurden in unserer Arbeitsgruppe zunächst hinsichtlich ihrer Eignung als therapeutische Moleküle beim malignen Melanom untersucht. In einem ersten Schritt wurde geprüft, ob die Präsenz virusähnlicher RNAs im Zytoplasma neben den bekannten immunstimulatorischen Effekten auch Einfluss auf das Überleben der Zellen zeigt und ob der mögliche zytotoxische Effekt auf Tumorzellen beschränkt ist. Hierzu wurden verschiedene Melanomzelllinien mit pppRNA oder poly(I:C) behandelt und die Zellvitalität bestimmt (*Abbildung 15A*). Beide Behandlungen führten in allen untersuchten Melanomzelllinien zu einer effektiven Verminderung der Zellvitalität (von 100% auf 20-50%). Im Gegensatz zu Melanomzellen reagierten nicht-maligne Hautzellen weniger sensitiv. Die Zellvitalität wurde in Fibroblasten, Keratinozyten und Melanozyten durch die Behandlung nicht drastisch verringert (*Abbildung 15B*). Durch Annexin V- und Propidiumjodid-Färbung wurde gezeigt, dass die verminderte Zellvitalität der Melanomzellen auf eine erhöhte Apoptoserate zurückzuführen ist, da durch die Transfektion der pppRNA zirka 60% der Melanomzellen in Apoptose gehen und sterben (*Abbildung 15C letzter schwarzer Balken*). Um aufzuklären, ob der rezeptorvermittelte oder der mitochondriale Apoptoseweg durch die Behandlung mit virusähnlichen RNAs aktiviert wird, wurden Schlüsselmoleküle beider Signalwege mittels RNA-Interferenz gehemmt (*Abbildung 15C*). Die siRNA-vermittelte Hemmung von Apaf-1 und Caspase 9, Schlüsselmolekülen des mitochondrialen Apoptoseweges, konnte die Apoptoseinduktion durch pppRNA signifikant verringern (*Abbildung 15C*). Hingegen hatte die Hemmung von Schlüsselmolekülen des rezeptorvermittelten Apoptoseweges wie FADD und Caspase 8 keinen Einfluss auf das Zellsterben. Weiterhin wurden Immunoblotanalysen von Caspase 8 und Caspase 9 durchgeführt, um die erwarteten Effekte der siRNA vermittelten Hemmungen zu bestätigen (*Abbildung 15D*). Eine Aktivierung der Caspasen kann im Immunoblot durch das Auftreten der gespaltenen aktiven Untereinheiten der Procaspasen nachgewiesen werden. Es ist zu erkennen, dass Caspase 8 und Caspase 9 durch die Behandlung mit pppRNA aktiviert werden (lane 5). Obwohl beide Proteasen Initiatorcaspasen sind, können sie in späteren Abschnitten der Apoptose als Resultat der Caspase-Kaskade durch die Effektorkaspasen aktiviert werden. Die Aktivierung der Caspase 9 kann vermindert werden, wenn Apaf-1 und Caspase 9 selbst durch siRNAs gehemmt werden. Die verminderte Caspase 9-Aktivität geht mit einer verminderten Zelltodinduktion einher (*Abbildung 15C*). Die aktiven Untereinheiten der Caspase 8 sind reduziert, wenn Apaf-1, Caspase 9 und Caspase 8 gehemmt werden. Jedoch führt die Hemmung des Adaptorproteins FADD, das für die initiale Aktivierung der Caspase 8 benötigt wird nicht zu einer verminderten Caspase-8-Aktivierung. Ausserdem geht die Hemmung von Caspase 8 nicht mit einer verminderten Apoptoseinduktion einher.

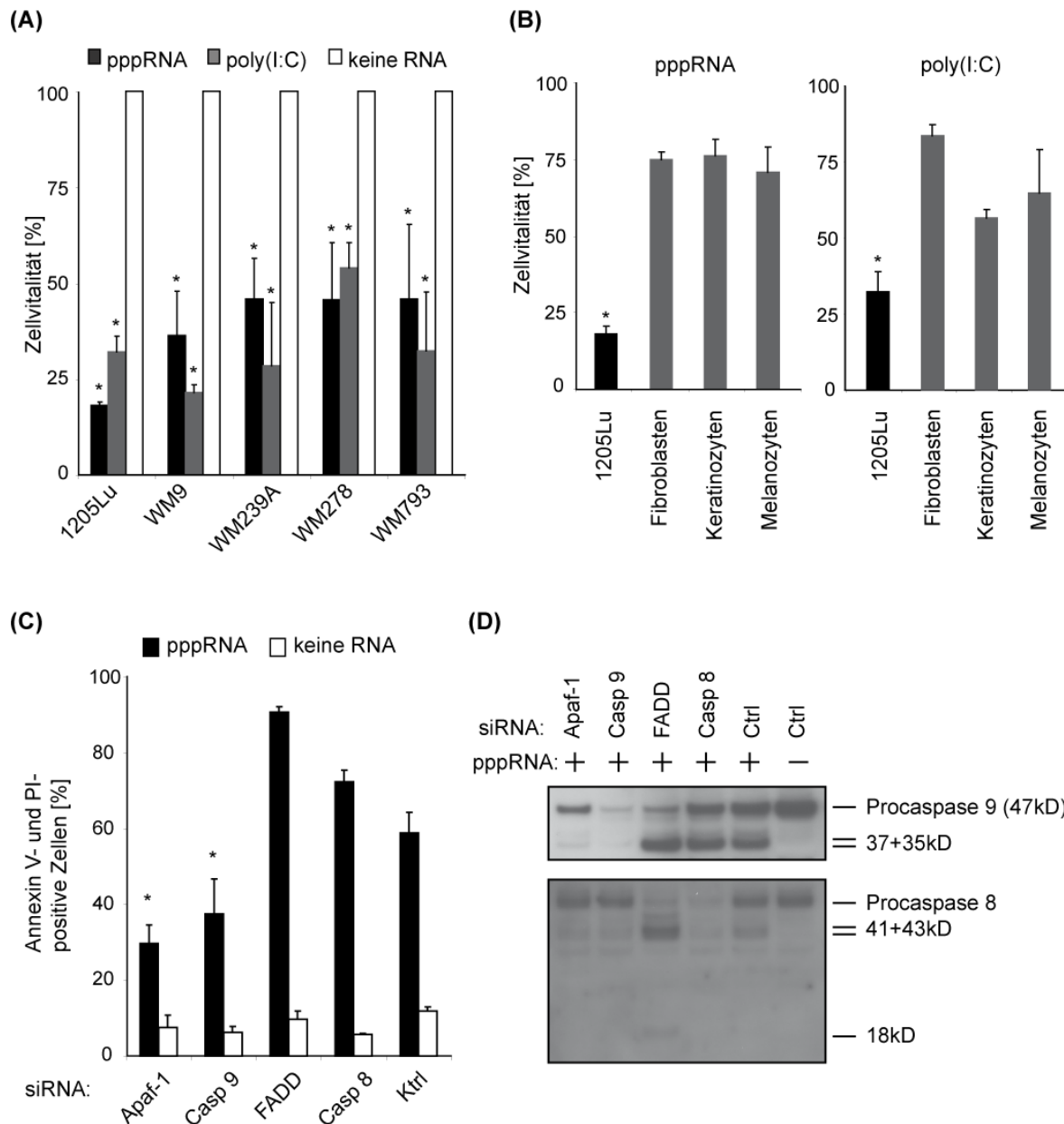


Abbildung 15: Tumorspezifische Zelltodinduktion durch virusähnliche RNAs

(A) Die Melanomzelllinien 1205Lu, WM9, WM239A, WM278 und WM793 wurden mit 1 µg/ µl pppRNA oder 3 ng/ ml poly(I:C), jeweils komplexiert mit Lipofectamin RNAiMax behandelt. Nach 17 h wurde die Zellvitalität mittels CellTiterBlue-Reagenz bestimmt. Zellen, die mit Transfektionsmittel allein behandelt wurden, wurden gleich 100% gesetzt. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten. * bezeichnet eine signifikante Reduktion der Zellvitalität gegenüber unbehandelten Zellen der gleichen Zelllinie..

(B) 1205Lu-Melanomzellen, Fibroblasten, Keratinozyten und Melanozyten wurden wie in (A) beschrieben behandelt und die Zellvitalität analysiert. Zellen, die mit Transfektionsmittel allein behandelt wurden, wurden gleich 100% gesetzt. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten. * bezeichnet eine signifikante Reduktion der Zellvitalität verglichen mit Fibroblasten, Keratinozyten und Melanozyten..

(C) 1205Lu-Melanomzellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert. Nach 48 h wurde die Transfektion zusammen mit komplexierter pppRNA wiederholt und nach weiteren 17 h wurde die Apoptoserate mittels Annexin V- und Propidiumjodid- Färbung analysiert. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten. * bezeichnet eine signifikante Reduktion der Apoptoserate gegenüber der Kontrolle.

(D) Caspase 8- und Caspase 9-Aktivierung wurde 12 h nach pppRNA-Stimulation im Immunoblot mit spezifischen Antikörpern, die sowohl die Procaspasen als auch die aktiven Untereinheiten detektieren, untersucht. Gezeigt ist ein repräsentativer Immunoblot von 2 unabhängigen Experimenten.

Demnach wird durch die Transfektion der pppRNA primär die Caspase 9 aktiviert, während Caspase 8 unspezifisch als Folge der Caspasen-Kaskade aktiviert wird.

Zusammengefasst wurde durch diese Analysen gezeigt, dass die Aktivierung der zytosolischen Rezeptoren RIG-I und MDA-5 zu einer melanomspezifischen Induktion der mitochondrialen Apoptose führt.

3.2.2. Noxa ist essentiell für die Apoptoseinduktion durch virusähnliche RNAs

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob BH3-only-Proteine durch die Behandlung mit pppRNA und poly(I:C) induziert werden und für die Aktivierung der Apoptose verantwortlich sind. Hierzu wurde in einem ersten Schritt die Expression der BH3-only-Proteine Noxa und Puma auf Proteinebene untersucht (*Abbildung 16A*). Die Immunoblotanalysen haben gezeigt, dass Noxa als auch Puma durch die Behandlung mit pppRNA und poly(I:C) in 1205Lu-Melanomzellen induziert sind.

Da die BH3-only-Proteine durch verschiedene Mechanismen reguliert werden können, gibt eine transkriptionelle Induktion nicht zwingend Aufschluss über die tatsächliche Aktivität des Proteins. Um zu überprüfen, welches BH3-only Protein für die Zelltodinduktion essentiell ist, wurden daher Melanomzellen mit spezifischen siRNAs gegen die proapoptotischen BH3-only-Proteine Noxa, Puma, Bim, Bad, Bik und Bid transfiziert und die Zellen im Anschluss mit pppRNA behandelt (*Abbildung 16B links*). Es zeigte sich, dass allein die Hemmung von Noxa die Apoptoserate von zirka 30% apoptotischen Zellen auf 15% apoptotische Zellen signifikant verringert. Die Hemmung anderer proapoptotischer BH3-only-Proteine zeigte dagegen keinen Einfluss. Auch bei der Behandlung mit poly(I:C) reduzierte die Noxa-Hemmung die Apoptose (*Abbildung 16B rechts*). Demnach ist die transkriptionelle Induktion von Noxa essentiell für die Apoptoseinduktion durch virusähnliche RNAs. Da die Transfektion von pppRNA und poly(I:C) in nicht-malignen Hautzellen nicht zur Apoptose führt wurde untersucht, ob die Induktion proapoptotischer BH3-only-Proteine melanomspezifisch erfolgt. Interessanterweise waren Noxa und Puma auch in primären humanen Fibroblasten, Melanozyten und Keratinozyten (*Abbildung 16C*) induziert, obwohl nur in Melanomzellen die Apoptose durch virale RNAs ausgelöst wird.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die Präsenz virusähnlicher RNAs im Zytosol maligner und nicht-maligner Hautzellen einen proapoptotischen Signalweg aktivieren, welcher in Melanomzellen zum Zelltod führt, während primäre Hautzellen resistent gegenüber der Apoptoseinduktion sind. Die transkriptionelle Hochregulation des proapoptotischen Proteins Noxa wurde als essentiell für die Apoptoseinduktion in Melanomzellen identifiziert. Ähnlich wie es bei Hemmung von Mcl-1 und A1 beobachtet wurde, führt die Aktivierung von Noxa, dem physiologischen Inaktivator von Mcl-1 und A1, zur Apoptose in Melanomzellen. Die durch die virusähnlichen RNAs vermittelte Noxa-Induktion zeigt hingegen in nicht-malignen Hautzellen nur eine gering ausgeprägte Zytotoxizität. Wodurch der tumorspezifische Effekt der Noxa-Aktivierung vermittelt wird, wurde in der folgenden Analyse näher untersucht.

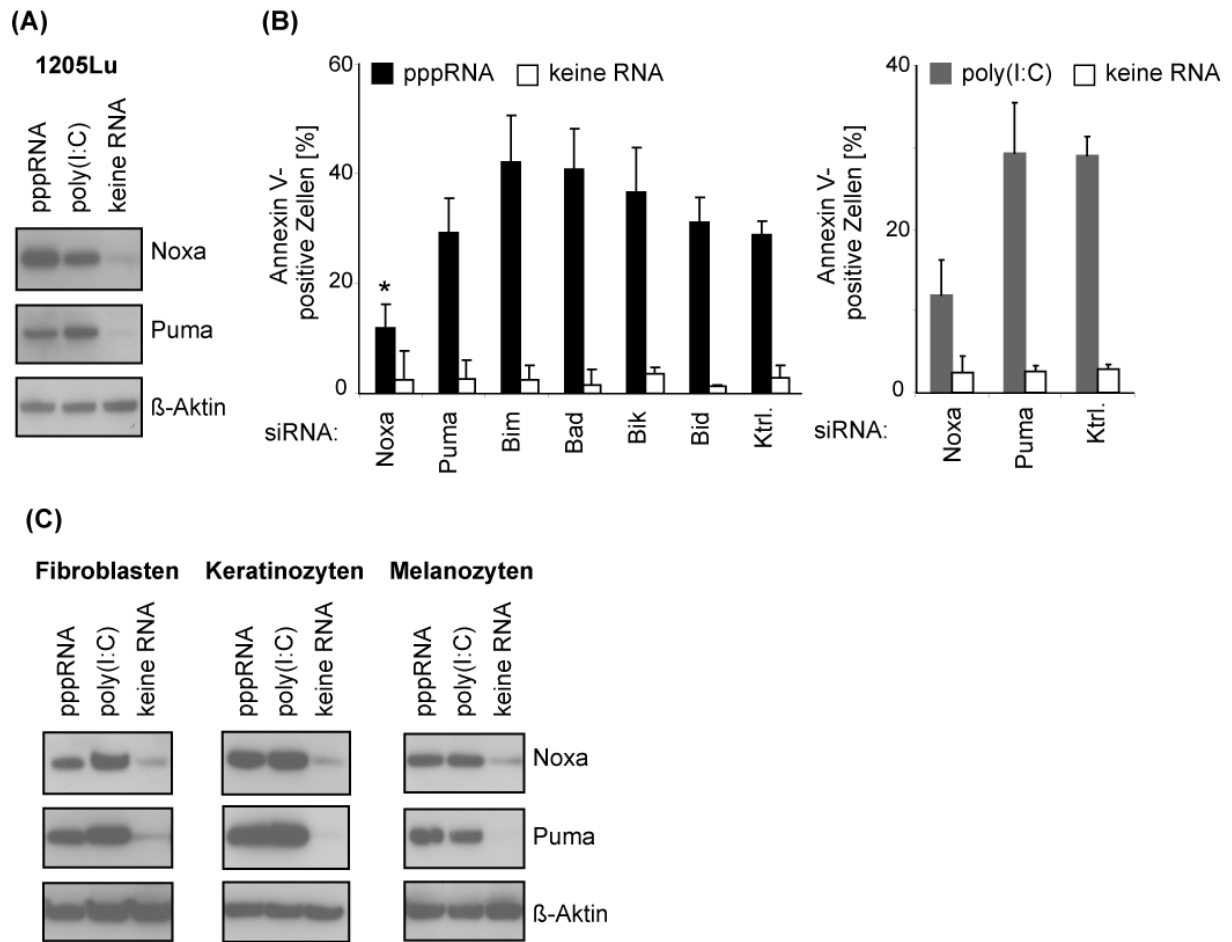


Abbildung 16: Noxa ist essentiell für die Induktion der Apoptose durch virusähnliche RNAs

(A) 1205Lu-Melanomzellen wurden mit pppRNA oder poly(I:C) behandelt. Nach 17 h wurde das Gesamtzellprotein im Immunoblot mit spezifischen Antikörpern gegen Noxa und Puma untersucht. Gezeigt ist ein repräsentativer Immunoblot von 2 unabhängigen Experimenten.

(B) 1205Lu-Melanomzellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert. Nach 48 h wurde die Transfektion zusammen mit komplexierter pppRNA (links) oder komplexiertem poly(I:C) (rechts) wiederholt und nach weiteren 17 h wurden Annexin V- positive Zellen im Durchflusszytometer ermittelt. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. * bezeichnet eine signifikante Reduktion der Apoptoserate gegenüber der Kontrolle.

(C) Fibroblasten, Keratinozyten und Melanozyten wurde mit pppRNA oder poly(I:C) behandelt. Nach 17 h wurde das Gesamtzellprotein im Immunoblot mit spezifischen Antikörpern gegen Noxa und Puma untersucht. Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Immunoblot von 2 unabhängigen Experimenten.

3.2.3. Bcl-xL verhindert die Apoptoseinduktion durch virusähnliche RNAs in nicht-maligen Hautzellen

Wichtige Gegenregulatoren der proapoptotischen BH3-only-Proteine sind die anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine, welche die Aktivität der BH3-only-Proteine hemmen und somit Apoptose verhindern können. Demnach wurde untersucht, ob antiapoptotische Bcl-2-Proteine die Apoptoseinduktion in nicht-maligen Hautzellen verhindern.

3.2.3.1. ABT sensibilisiert Fibroblasten für pppRNA und poly(I:C)

In einem ersten Schritt wurden Versuche mit der chemischen Substanz ABT-737 durchgeführt. Primäre humane Fibroblasten und Melanomzellen wurden mit ABT-737 und den virusähnlichen RNAs pppRNA und poly(I:C) behandelt. Nach 17 h wurde die Zellvitalität als Indikator für die Zelltodinduktion untersucht (*Abbildung 17 links*). Die alleinige Behandlung von Fibroblasten mit ABT-737 oder mit virusähnlichen RNAs zeigte keinen Einfluss auf die Zellvitalität. Die Kombination beider Behandlungen führte zu einer Reduktion der Zellvitalität auf 45% im Falle von pppRNA und ABT-737 oder auf 35% im Falle von poly(I:C) und ABT-737. In 1205Lu-Melanomzellen (*Abbildung 17 rechts*) wurde die durch pppRNA oder poly(I:C) vermittelte Reduktion der Zellvitalität durch die kombinierte Behandlung mit ABT-737 noch weiter verstärkt.

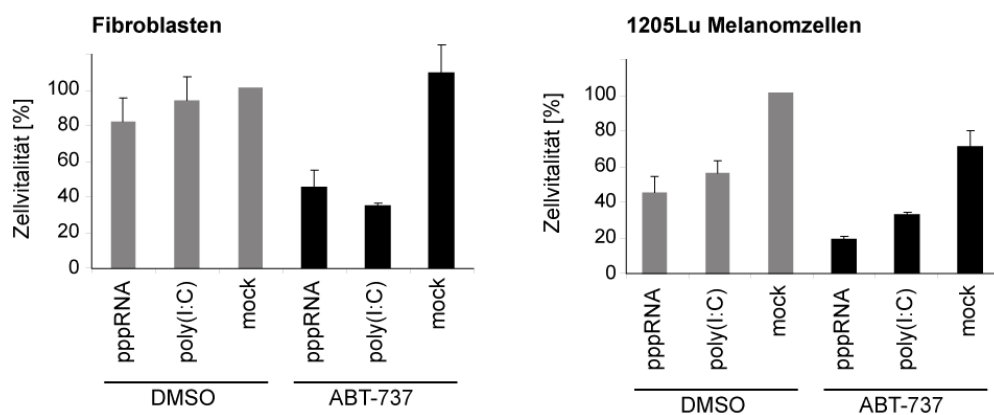


Abbildung 17: ABT-737 sensibilisiert Fibroblasten für die Behandlung mit pppRNA und poly(I:C)

Fibroblasten (links) und 1205Lu-Melanomzellen (rechts) wurden mit ABT-737 oder dem Lösungsmittel DMSO behandelt und gleichzeitig mit den angegebenen RNAs transfiziert. Nach 17 h wurde die Zellvitalität bestimmt. Zellen, die nur mit Transfektionsmittel und DMSO behandelt wurden, wurden gleich 100% gesetzt. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten.

Diese Daten lassen darauf schließen, dass die antiapoptotischen Proteine, die durch ABT-737 inhibiert werden, nämlich Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w, die Resistenz von primären humanen Fibroblasten gegenüber der Apoptoseinduktion durch virusähnliche RNAs vermitteln.

3.2.3.2. Die Hemmung von Bcl-xL sensibilisiert primäre Zellen für die Apoptoseinduktion durch virusähnliche RNAs

Um zu evaluieren, welches dieser drei antiapoptotischen Proteine die Zelltodinduktion in nicht-malignen Hautzellen verhindert, wurden siRNAs verwendet, die die Expression von Bcl-2, Bcl-xL oder Bcl-w inhibieren. Die Hemmung von Bcl-2 oder Bcl-w führte nicht zur Apoptoseinduktion durch pppRNA oder poly(I:C). Wurde dagegen Bcl-xL inhibiert, kam es zum massiven Absterben von Fibroblasten (*Abbildung 18A links*). Die Bcl-xL-Hemmung und Behandlung mit pppRNA oder poly(I:C) führte zu etwa 80% apoptotischen und toten Zellen, während die Behandlung mit pppRNA oder poly(I:C) ohne Bcl-xL-Hemmung keinen Zelltod induzierte. Die Hemmung von Bcl-xL sensibilisierte auch primäre humane Keratinozyten für

die Zelltodinduktion durch virusähnliche RNAs (*Abbildung 18A rechts*). Durch die Hemmung von Bcl-xL und die Behandlung mit pppRNA oder poly(I:C) wurde eine Apoptoserate von 82% beziehungsweise 70% erzielt. Hingegen hatte auch in Keratinozyten die Hemmung von Bcl-2 oder Bcl-w keinen apoptosefördernden Effekt. In Melanomzellen konnte die Hemmung von Bcl-xL die pppRNA oder poly(I:C) vermittelte Apoptoseinduktion nicht signifikant erhöhen (*Abbildung 18A unten*).

(A)

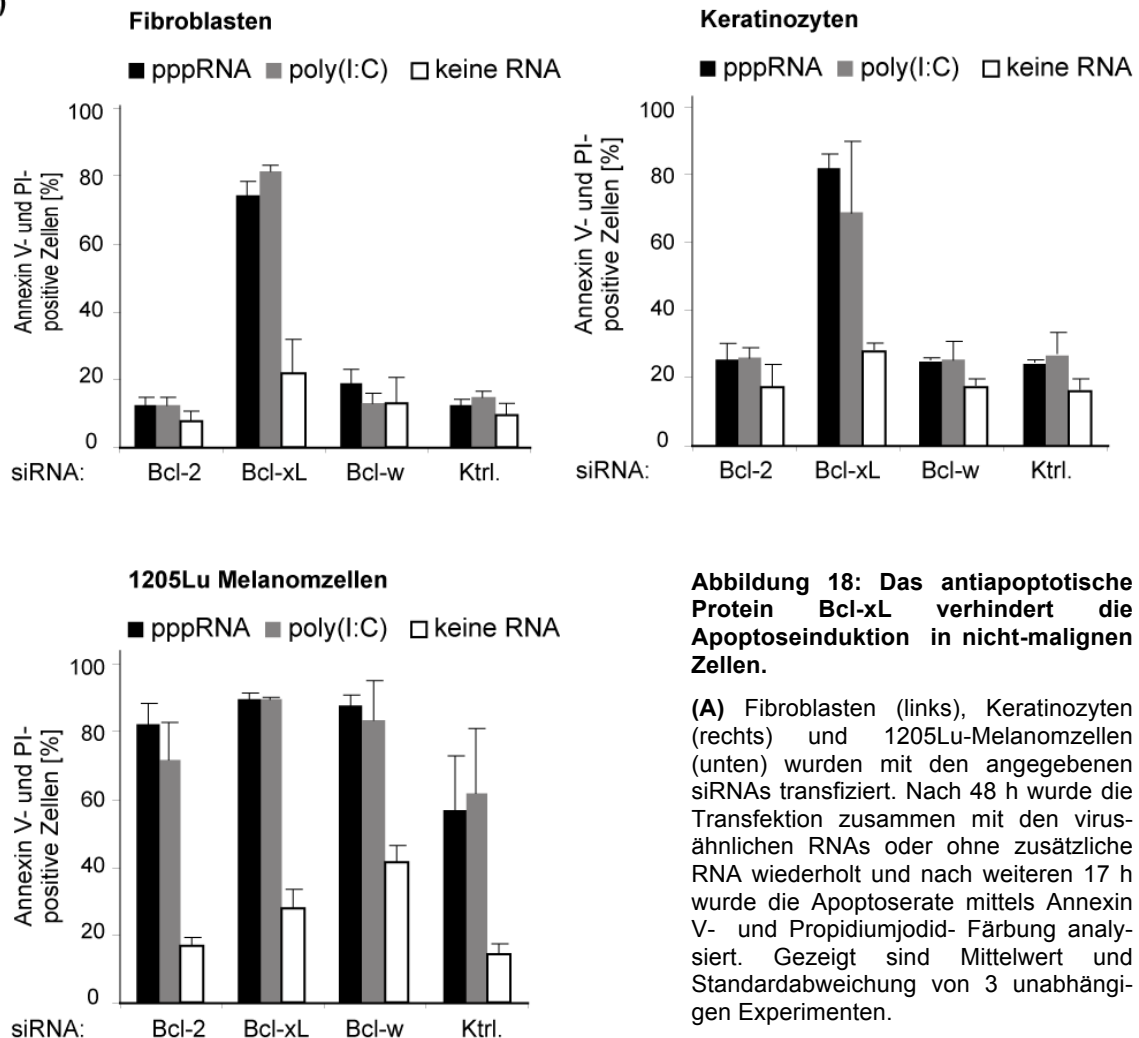
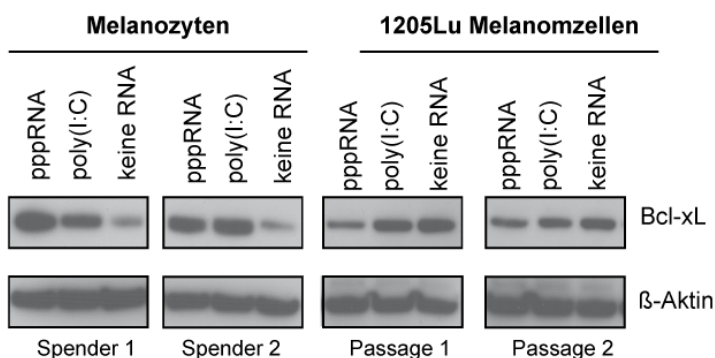


Abbildung 18: Das antiapoptotische Protein Bcl-xL verhindert die Apoptoseinduktion in nicht-malignen Zellen.

(A) Fibroblasten (links), Keratinozyten (rechts) und 1205Lu-Melanomzellen (unten) wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert. Nach 48 h wurde die Transfektion zusammen mit den virusähnlichen RNAs oder ohne zusätzliche RNA wiederholt und nach weiteren 17 h wurde die Apoptoserate mittels Annexin V- und Propidiumjodid-Färbung analysiert. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten.

(B)



(B) Gesamtzellprotein von 2 Melanozyten-Spendern (links) und 2 Passagen der 1205Lu-Melanomzellen (rechts) wurde 17 h nach der Behandlung mit pppRNA oder poly(I:C) isoliert und im Immunoblot mit einem spezifischen Antikörper gegen Bcl-xL untersucht. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

Demnach scheint Bcl-xL ein wichtiger Gegenregulator der pppRNA- und poly(I:C)-vermittelten Apoptose in Fibroblasten und Keratinozyten zu sein. Immunoblotanalysen lieferten einen weiteren Hinweis dafür, dass Bcl-xL eine wichtige Rolle bei der Umgehung der Apoptose nach Gabe von virusähnlichen RNAs spielt. Die Behandlung von Melanozyten mit pppRNA oder poly(I:C) führte zu einer Hochregulation von Bcl-xL (*Abbildung 18B links*), während in Melanomzellen diese Gegenregulation nicht zu beobachten war (*Abbildung 18B rechts*). Das antiapoptotische Protein Bcl-xL schützt demnach nicht-maligne Hautzellen vor der Zelltodinduktion durch virusähnliche RNAs, während Melanomzellen diesen Rettungsmechanismus verloren zu haben scheinen.

3.3. Transkriptionelle Regulation von Noxa nach der Behandlung mit pppRNA

Die Aktivierung von Noxa, einem Inaktivator von Mcl-1 und A1, durch virusähnliche RNAs resultiert in einer tumorspezifischen Apoptoseinduktion. Diese Studien zeigen, dass Noxa eine zentrale Bedeutung bei der Zelltodregulation von Melanomzellen einnimmt. Daher wurde der Frage nachgegangen, über welche Mechanismen Noxa durch virusähnliche RNAs aktiviert wird. Prinzipiell kann Noxa durch eine Vielzahl von Stimuli, wie Wachstumsfaktorentzug oder DNA-Schäden aktiviert werden, wobei die Regulation hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene stattfindet. Ein besseres Verständnis der transkriptionellen Regulation von Noxa ist demnach von großer Bedeutung für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien für das Melanom.

3.3.1. Der Promotorbereich von Noxa

Um die transkriptionelle Regulation von Noxa nach der Behandlung mit virusähnlichen RNAs zu untersuchen, wurde zuerst der Noxa-Promotorbereich auf potentielle Transkriptionsfaktor-Bindestellen untersucht. Als Noxa-Promotorbereich gilt ein zirka 1000 Basenpaare (bp) langes DNA-Fragment welches stromaufwärts der Noxa-Transkriptionsstartstelle liegt [32, 75]. Durch die *In-Silico*-Analyse (MatInspector) dieses Fragmentes wurden 214 Transkriptionsfaktoren identifiziert, die an die im Promotor enthaltenen Bindungsmotive binden können. Zu berücksichtigen ist hierbei, dass die identifizierten Transkriptionsfaktoren nur mit einer theoretischen Wahrscheinlichkeit an die analysierte DNA-Sequenz binden und keinerlei Aufschluss über die tatsächliche Aktivität geben. Um einen möglichen funktionellen Zusammenhang zu ermitteln, wurde zusätzlich eine Literaturanalyse unter Verwendung der BiblioSphere PathwayEdition Software (Genomatix) durchgeführt. Diese Software durchsucht die Pubmed-Datenbank nach Gen/Gen und Gen/Transkriptionsfaktor Interaktionen. Diese bioinformatischen Analysen wurden, in Kooperation, von Dr. Martin Irmeler (Helmholtz Zentrum, München) durchgeführt. In *Abbildung 19* ist der Noxa-Promotorbereich mit den durch die MatInspector und BiblioSphere Analyse identifizierten, potentiellen und funktionell bedeutenden Transkriptionsfaktor-Bindundsmotiven dargestellt.

An die angegebenen Bindungsmotive können mehrere Faktoren einer Transkriptionsfaktorfamilie binden.

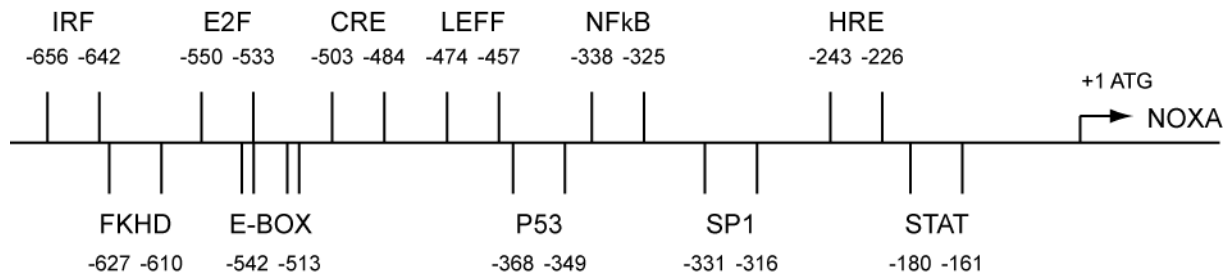


Abbildung 19: Übersicht der durch *In-Silico*-Analyse identifizierten Transkriptionsfaktor-Bindestellen im Noxa-Promotorbereich

IRF: Interferon regulatory factor; FKHD: Forkhead transcription factors; E2F: E2 binding factor; CRE: cAMP response element; E-Box: Enhancer-Box; LEF: Lymphoid enhancer factor; P53: Protein 53; NFkB: Nuclear factor kappa B; SP1: Specificity protein 1; HRE: Hypoxia response element; STAT: Signal transducer and activator of transcription.

Zusätzlich zur *In-Silico*-Analyse des Promotorbereichs wurde deshalb eine manuelle Literatursuche durchgeführt und nach Faktoren gesucht, welche die Transkription von Noxa regulieren können. Die Ergebnisse sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt.

Tabelle 6: Noxa regulierende Bindestellen und Transkriptionsfaktoren

Bindestelle	Potentiell bindender Faktor	Literaturnachweis
P53	p53	Oda et al 2000; [32]
E-BOX	c-MYC	Soengas 2007; [91]
HRE	HIF1 α	Jee-Youn Kim 2004; [92]
NF κ B	NFKB1; REL-A	O'Prey 2010; Martin 2009; [93, 94]
CRE	CREB1	Lallemant 2007; [75]
IRF	IRF-1; IRF-3	Lallemant 2007; [75]

Die funktionelle Relevanz dieser Kandidaten wurde im Folgenden auf ihre Beteiligung an der Noxa-Induktion nach Stimulation mit virusähnlichen RNAs untersucht. In den Versuchen wurde zunächst pppRNA als Stimulus verwendet.

3.3.2. Die pppRNA-vermittelte Noxa-Induktion ist unabhängig von p53 und HIF1 α

Noxa und Puma sind als klassische Zielgene des Tumorsuppressors p53 bekannt und als solche essentiell für die p53-vermittelte Apoptoseinduktion nach DNA-Schädigung [31, 32]. Im Gegensatz zu anderen Tumoren ist p53 beim malignen Melanom nur selten mutiert und könnte potentiell für die Induktion von Noxa und Puma verantwortlich sein.

In einem ersten Schritt wurde untersucht, ob die Noxa- und Puma-Induktion über p53 vermittelt wird. Hierzu wurde p53 in 1205Lu-Melanomzellen durch eine p53-spezifische

siRNA gehemmt und die Zellen anschließend mit pppRNA behandelt. Immunoblotanalysen (Abbildung 20A) bestätigen die erfolgreiche Hemmung von p53. Die Immunoblotanalyse zeigt, dass die Induktion von Noxa unabhängig von p53 ist, da das Noxa-Protein in p53-gehemmten Zellen sowie in Kontrollzellen nach pppRNA-Gabe gleichermaßen erhöht ist.

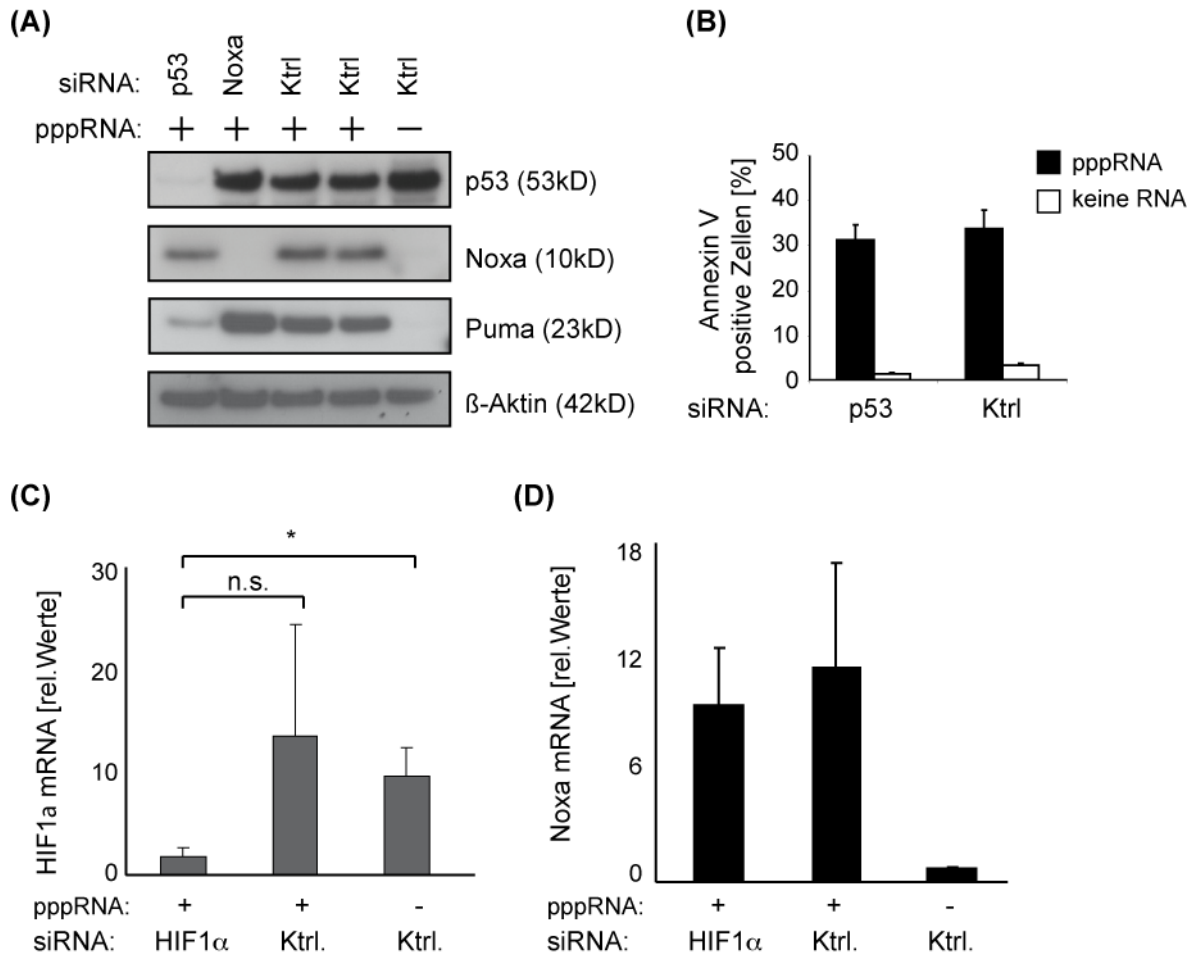


Abbildung 20: Die Noxa-Induktion ist unabhängig von p53 und HIF1 α

(A) 1205Lu Melanomzellen wurden mit den angegebenen siRNAs behandelt. Nach 48 h wurden die siRNAs erneut zusammen mit der pppRNA transfiziert. Nach weiteren 17 h wurde das Gesamtprotein der Zellen im Immunoblot mit spezifischen Antikörpern gegen p53, Noxa, Puma oder β -Aktin analysiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Immunoblot von 3 unabhängigen Experimenten.

(B) 1205Lu-Melanomzellen wurden wie in (A) beschrieben behandelt und die Apoptoseinduktion mittels Annexin V-Färbung ermittelt. Gezeigt ist Mittelwert und Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten.

(C) 1205Lu-Melanomzellen wurden mit den angegebenen siRNAs behandelt. Nach 48 h wurden die siRNAs erneut zusammen mit der pppRNA transfiziert. Nach weiteren 17 h wurde die HIF1 α -mRNA analysiert. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten. * bezeichnet eine signifikante Reduktion der mRNA; Die Kennzeichnung n.s. bezeichnet einen nicht signifikanten Unterschied.

(D) 1205Lu-Melanomzellen wurden wie in (C) beschrieben behandelt und die Noxa-mRNA mittels qRT-PCR analysiert. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten.

Im Gegensatz dazu ist die Induktion von Puma in p53-gehemmten Zellen stark verringert, was darauf hinweist, dass die Puma-Induktion durch p53 reguliert wird. Die nachfolgende Analyse der Apoptoserate nach pppRNA-Stimulation ergab, dass die Zelltodinduktion

unabhängig vom p53 stattfindet, da die Apoptose in p53-gehemmten Zellen unvermindert induziert wird (*Abbildung 20B*).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die bei Stimulation mit virusähnlicher RNA beobachtete Induktion von Puma über p53 erfolgt, nicht aber die Induktion von Noxa. Ebenso ist zu erkennen, dass die pppRNA-induzierte Apoptose unabhängig von p53 stattfindet. Dies ist im Einklang mit den unter Punkt 3.2.2. beschriebenen Ergebnissen, die zeigten, dass bei Hemmung von Puma und Noxa nur die Inhibition von Noxa zu einer Verringerung der durch virusähnliche RNAs induzierten Apoptose führt.

Wie bereits erwähnt, kann Noxa stimulusabhängig durch eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren reguliert werden. Noxa ist beispielsweise für den Zelltod durch Hypoxie unentbehrlich und ist in diesem Fall transkriptionelles Zielgen von HIF1 α [92]. Um zu überprüfen, ob HIF1 α für die pppRNA-vermittelte Noxa-Induktion verantwortlich ist, wurde eine siRNA entworfen, um HIF1 α zu hemmen. Die Transfektion der HIF1 α -spezifischen siRNA führte nach Stimulation mit pppRNA zu einer signifikanten Reduktion der HIF1 α -mRNA (*Abbildung 20C*). Die Analyse der Noxa-mRNA in HIF1 α -gehemmten Zellen ergab jedoch nach pppRNA-Stimulation keinen Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (*Abbildung 20D*). Demnach ist HIF1 α für die transkriptionelle Regulation von Noxa nach Stimulation mit virusähnlichen RNAs entbehrlich. Somit konnte HIF1 α als Noxa-regulierender Faktor bei Stimulation mit virusähnlichen RNAs ausgeschlossen werden.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass weder p53 noch HIF1 α für die Noxa-Induktion nach der Behandlung mit pppRNA essentiell sind.

3.3.3. Die pppRNA-vermittelte Noxa-Induktion ist unabhängig von dem kanonischen NF- κ B-Signalweg

Obwohl NF- κ B in vielen Zellen eine antiapoptotische Funktion inne hat, gibt es einige Belege dafür, dass NF- κ B auch eine proapoptotische Funktion haben kann [95, 96]. Von besonderem Interesse bei der Apoptoseinduktion durch virusähnliche RNAs ist NF- κ B auch deshalb, weil die Aktivierung der Rezeptoren RIG-I und MDA-5 eine NF- κ B-Aktivierung zur Folge hat. Ob NF- κ B bei der transkriptionellen Regulation von Noxa nach Stimulation mit pppRNA beteiligt ist, wurde in der folgenden Analyse untersucht.

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist ein Dimer gebildet aus Proteinen der NF- κ B/Rel Familie, welche fünf Mitglieder enthält: NFKB1 (p50 und sein Vorläufer p105), NFKB2 (p52 und sein Vorläufer p100), c-Rel, RelA (p65) und RelB. Es existieren zwei typische Signalwege, die zur Aktivierung der NF- κ B-Dimere führen können, der klassische (kanonische), sowie der alternative Signalweg. Das am häufigsten auftretende NF- κ B-Dimer ist das p50/p65 (NFKB1/Rel-A) Dimer, und Bindestellen für dieses Dimer wurden auch durch die MatInspector Analyse in dem Noxa-Promotorbereich identifiziert. Reguliert wird die transkriptionelle Aktivität dieses Dimers durch den kanonischen NF- κ B Signalweg, der in *Abbildung 21A* schematisch dargestellt ist.

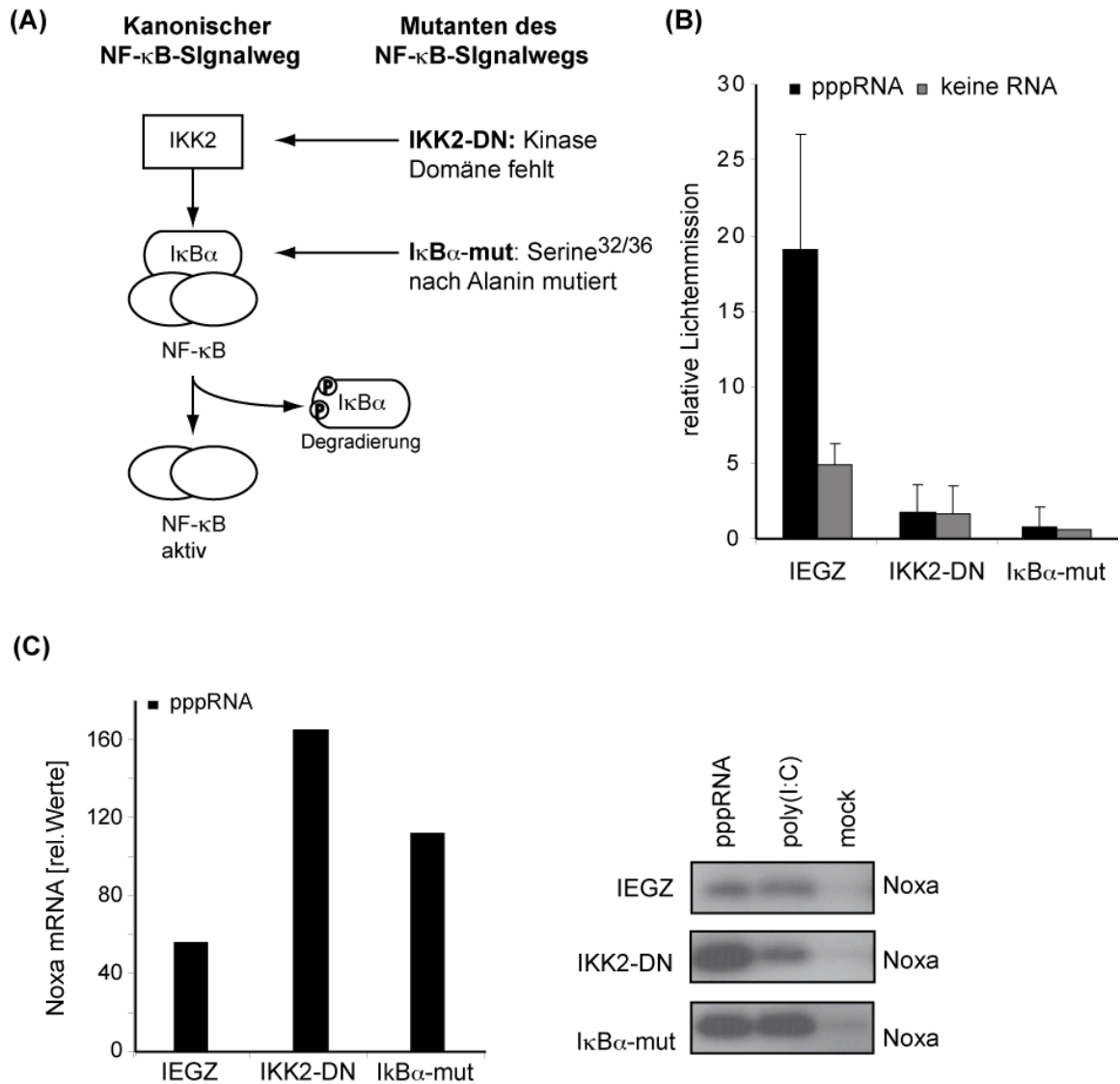


Abbildung 21: Die Rolle von NF- κ B bei der Noxa-Induktion

(A) Schematische Darstellung des NF- κ B-Signalweges und der verwendeten Mutanten: Der kanonische NF- κ B-Signalweg kann durch die Überexpression dominant-negativer (DN) Mutanten der Kinase IKK2 oder des Inhibitors IκBα gehemmt werden.

(B) Durch retroviralen Gentransfer wurde der Leervektor (IEGZ) oder die Mutanten IKK2-DN und IκBα-mut stabil in 1205Lu-Melanomzellen eingebracht. Diese Zellen wurden mit einem NF- κ B-Reporter-Konstrukt, welches NF- κ B-abhängig die Firefly-Luziferase exprimiert, transfiziert. Nach 24 h wurden diese Zellen mit pppRNA stimuliert und nach 17 h die Luziferase-Abhängige Lichtemission als Indikator für die NF- κ B-Aktivität analysiert. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten.

(C) IEGZ, IKK2-DN und IκBα exprimierende 1205Lu-Melanomzellen wurden mit pppRNA stimuliert und die Noxa-Expression nach 17 h auf mRNA-Ebene (links) mittels qRT-PCR und auf Proteinebene im Immunoblot (rechts) untersucht.

Die NF- κ B-Dimere sind im Zytosol an ihre Inhibitoren, die IκB-Proteine, gebunden, wodurch eine Translokation in den Nukleus, und somit eine transkriptionelle Aktivität verhindert wird. Der entscheidende Schritt bei der Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalweges ist die Degradation des Inhibitors IκB. Vermittelt wird diese durch einen IκB-Kinase (IKK)-Komplex, der aus den katalytischen Untereinheiten IKK-1 (IKKα) und IKK-2 (IKKβ) sowie einer

regulatorischen Untereinheit NEMO ($\text{IKK}\gamma$) besteht. Durch die Aktivierung des IKK -Komplexes wird der Inhibitor $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ an zwei Serinresten (Ser32; Ser36) phosphoryliert. Dies führt zur Polyubiquitinierung und so zur Degradation von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ im 26S Proteasom. Die freigesetzten $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Dimere können nun in den Nukleus translokalisieren und die Transkription ihrer Zielgene regulieren. Die $\text{I}\kappa\text{B}$ -Degradation induziert zudem die Phosphorylierung von p65, welche eine Voraussetzung für die transkriptionelle Aktivität von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ im Zellkern ist [97].

In 1205Lu-Melanomzellen wurde untersucht, ob $\text{NF-}\kappa\text{B}$ bei der transkriptionellen Regulation von Noxa nach pppRNA-Stimulation involviert ist. Hierzu wurden durch retroviralen Gentransfer dominant negative Mutanten des $\text{NF-}\kappa\text{B}$ Signalweges stabil in 1205Lu-Zellen exprimiert. Eingbracht wurde der Leervektor (IEGZ), eine dominant-negative Mutante von IKK2 (IKK2-DN), der die Kinase-Domäne fehlt, oder eine Mutante des $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ Proteins ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha\text{-mut}$), bei dem das Serin 32 und das Serin 36 durch Alanin ausgetauscht wurde, wodurch eine Phosphorylierung des Inhibitors verhindert wird. Die Überexpression dieser mutierten Proteine führt in beiden Fällen dazu, dass die Freisetzung des $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Dimers vom $\text{I}\kappa\text{B}$ -Komplex verhindert wird, und so $\text{NF-}\kappa\text{B}$ nicht aktiviert werden kann (*Abbildung 21A*).

Die transkriptionelle Aktivität von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ wurde anhand eines $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Reportervektors bestimmt, welcher sechs $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Konsensus-Sequenzen beinhaltet. Zellen, die den Leervektor (IEGZ) oder je eine der Mutanten exprimieren, wurden nach pppRNA-Gabe untersucht. In den Kontrollzellen (IEGZ) wird durch die Stimulation mit pppRNA die Luziferase-Aktivität erhöht, wobei in IKK2-DN und $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\text{-mut}$ exprimierenden Zellen die transkriptionelle Aktivität von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ verhindert ist (*Abbildung 21B*). Um den Einfluss der Hemmung des kanonischen $\text{NF-}\kappa\text{B}$ Signalweges auf die pppRNA-induzierte Noxa-Expression zu untersuchen, wurden die Kontrollzellen sowie die IKK2-DN - und $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\text{-mut}$ -exprimierenden Zellen mit pppRNA behandelt und die Noxa- Expression auf mRNA- sowie Protein-Ebene untersucht (*Abbildung 21C*). Es zeigte sich, dass die Noxa-Expression in den $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -gehemmten Zellen sogar höher war als in den Kontrollzellen. Der kanonische $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Signalweg scheint also bei der pppRNA-vermittelten Noxa-Induktion eher eine hemmende Rolle zu spielen.

3.3.4. Die CRE- und IRF-Bindestellen sind wichtig für die Noxa-Induktion

In einer Studie, die die Apoptoseinduktion nach viraler Infektion untersucht hat, wurde gezeigt, dass Noxa in Vesicular Stomatitis Virus- (VSV-), Sendai Virus- (SV-), Masern Virus- und Herpes Simplex Virus-infizierten Zellen induziert ist und für die Einleitung der Apoptose essentiell ist. Bei diesen Experimenten schienen die Transkriptionsfaktoren IRF-1, IRF-3 und CREB1 an der Noxa-Induktion beteiligt zu sein [75]. Da durch die Transfektion virusähnlicher RNAs eine virale Infektion imitiert wird, wurde in einem nächsten Schritt der Einfluss dieser Faktoren auf die Noxa-Induktion bei Behandlung mit pppRNA untersucht. Hierzu wurden zuerst Luziferase-Reporterplasmide, die den Noxa-Promotor beinhalten, eingesetzt. Die verwendeten Reporter enthalten ein 1kB Fragment stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle von Noxa, welches den Noxa-Promotor (wt-Noxa-luc) oder den gleichen

Promotorbereich mit Mutationen in der IRF-, CRE- oder p53- Bindestelle (*Abbildung 22A*) beinhaltet. Die gleichen Vektoren wurden auch in der Arbeit von Lallemand et al. verwendet. In dieser Arbeit wurde *in vitro* gezeigt, dass eine CRE-Bindestelle zirka 240bp stromaufwärts der Noxa-Transkriptionsstartstelle liegt, die in der MatInspector-Analyse nicht als solche identifiziert wurde [75]. Analog zu Noxa, wird auch der Wildtyp-Reporter durch Stimulation mit pppRNA aktiviert (*Abbildung 22B*).

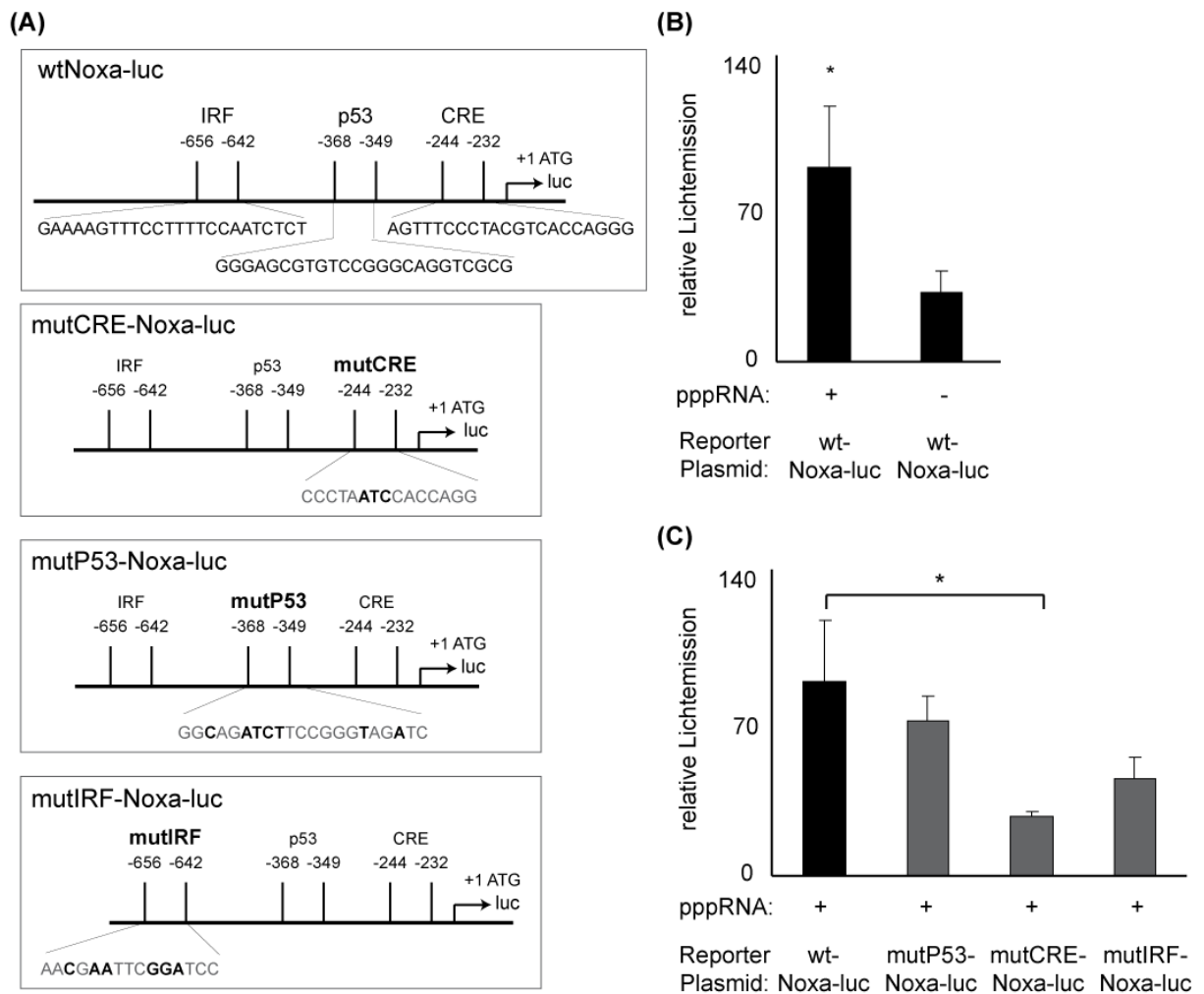


Abbildung 22: Die Rolle der CRE- und IRF-Bindestellen bei der pppRNA-vermittelten Noxa-Induktion

(A) Schematische Darstellung der verwendeten Noxa-Promotor-Luziferase-Reporter: Die verwendeten Reporter exprimieren die Luziferase unter der Kontrolle eines 1000bp-Fragmentes stromaufwärts der Noxa-Transkriptionsstartstelle. Das Plasmid wtNoxa-luc beinhaltet diesen Bereich fehlerfrei. Die drei restlichen Plasmide beinhalten diesen Bereich mit Mutationen in den angezeigten Bindestellen. Ausgetauschte Nukleotide sind fett gedruckt dargestellt.

(B) 1205Lu Melanomzellen wurden mit dem wtNoxa-luc-Reporter-Plasmid transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen gewaschen, das Medium ersetzt, die Zellen mit pppRNA behandelt und nach weiteren 17 h luminometrisch analysiert. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten. * bezeichnet eine signifikant erhöhte Lichtemission verglichen mit unstimulierten Zellen.

(C) 1205Lu-Melanomzellen wurden mit den wtNoxa-luc-, mutP53-Noxa-luc-, mutCRE-Noxa-luc- und mutIRF-Noxa-luc-Reporter-Plasmiden transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen gewaschen und mit pppRNA behandelt. Nach weiteren 17 h wurden die Zellen luminometrisch analysiert. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten. * bezeichnet eine signifikante Reduktion der Lichtemission im Vergleich zu wt-Noxa-luc.

Verglichen mit dem Wildtyp-Noxa-Promotor führen Mutationen in der CRE-Bindestelle zu einer signifikanten Verringerung der Luziferase-Aktivität nach Transfektion von pppRNA. In geringerem aber nicht signifikantem Maße verringerte auch die Mutation in der IRF-Bindestelle die Lichtemission, wobei die Mutation der p53-Bindestelle keinen Effekt zeigte (*Abbildung 22C*). Wie auch nach viraler Infektion scheinen Transkriptionsfaktoren, die an das CRE- und IRF-Element im Noxa-Promotor binden für die Noxa-Transkription bei pppRNA-Behandlung verantwortlich zu sein.

Es gibt eine ganze Reihe von Transkriptionsfaktoren die an das CRE- oder IRF-Bindungsmotiv binden können. In einem weiteren Schritt wurde zunächst untersucht, ob die Transkriptionsfaktoren IRF-1, IRF-3 oder CREB1 an der Noxa-Induktion nach pppRNA-Transfektion beteiligt sind.

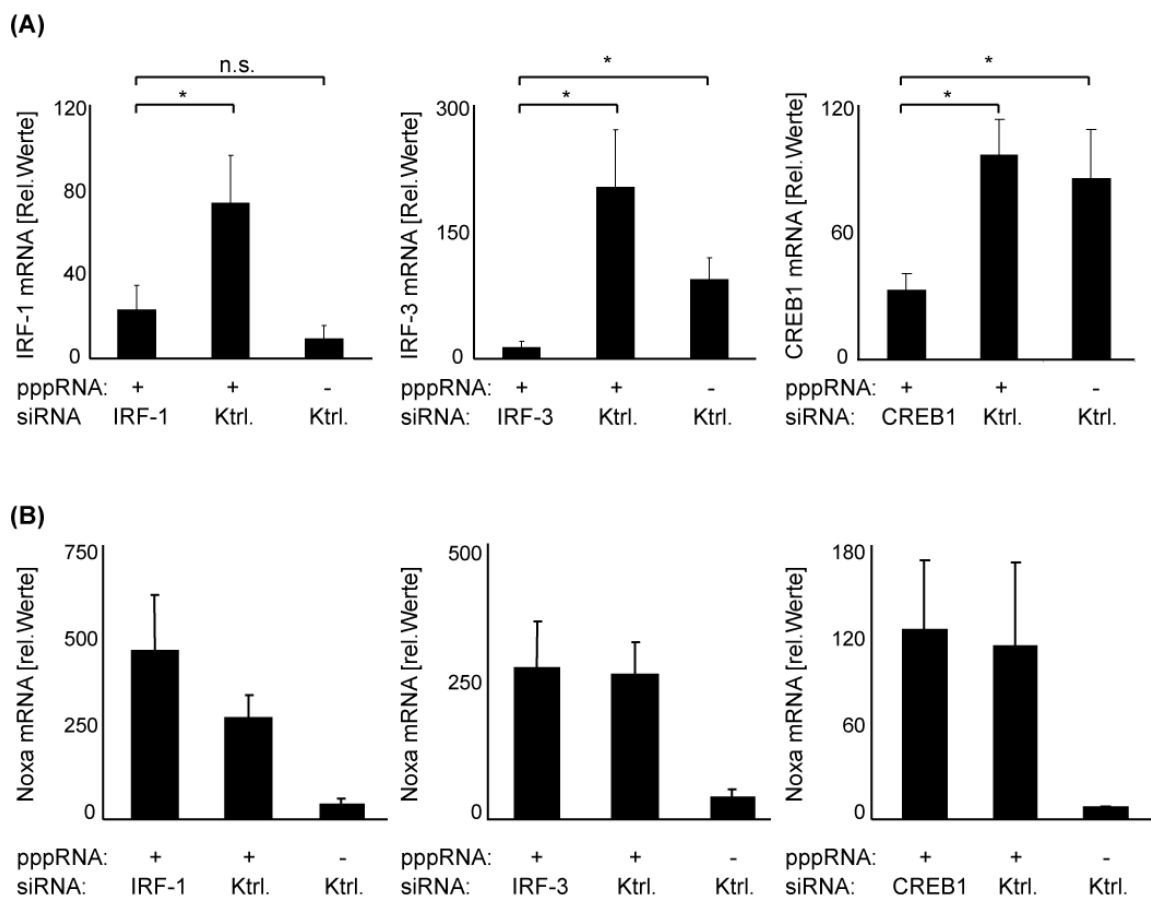


Abbildung 23: Die Rolle der CRE- und IRF-Bindestellen bei der pppRNA-vermittelten Noxa-Induktion

(A) 1205Lu-Melanomzellen wurden mit den angegebenen siRNAs behandelt. Nach 48 h wurden die siRNAs erneut zusammen mit der pppRNA transfiziert. Nach weiteren 17 h wurde die IRF-1-, IRF-3- und CREB1-mRNA mittels qRT-PCR analysiert. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten. * bezeichnet eine signifikante Reduktion der mRNA; Die Kennzeichnung n.s. bezeichnet einen nicht signifikanten Unterschied.

(B) 1205Lu-Melanomzellen wurden wie in (A) beschrieben behandelt und die Noxa-mRNA mittels qRT-PCR analysiert. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten.

Durch spezifische siRNAs wurde die Expression von IRF-1, IRF-3 und CREB1 in 1205Lu-Melanomzellen gehemmt (*Abbildung 23A*). Anschließend wurden diese Zellen mit pppRNA behandelt und die Noxa-Expression auf mRNA-Ebene analysiert. Weder durch die

Hemmung von CREB1 noch durch die Hemmung von IRF-1 oder IRF-3 war die Noxa-Induktion nach Transfektion von pppRNA verringert (*Abbildung 23B*).

Zusammengefasst zeigen diese Analysen, dass die CRE- und IRF-Bindestellen in dem Noxa-Promotor für die pppRNA-vermittelte Noxa-Induktion von Bedeutung sind. Die Transkriptionsfaktoren IRF-1, IRF-3 und CREB1 sind einzeln jedoch nicht für die Induktion von Noxa essentiell.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Regulation und Funktion der Bcl-2-Proteinfamilie im malignen Melanom und nicht-malignen Hautzellen untersucht, um neue therapeutische Angriffspunkte für eine melanomspezifische Zelltodinduktion zu identifizieren. Weiterhin wurden virusähnliche RNAs hinsichtlich ihrer Wirksamkeit als therapeutische Substanz und die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen analysiert.

Im ersten Teil der Arbeit wurden durch die funktionelle Analyse antiapoptotischer Bcl-2-Proteine Mcl-1 und A1 identifiziert, die für das Überleben von Melanomzellen essentiell sind. Im Gegensatz dazu sind nicht-maligne Hautzellen (Fibroblasten, Keratinozyten) nicht auf die Expression dieser Proteine angewiesen. Die melanomspezifische Apoptose wurde weiterhin durch die zusätzliche Exposition gegenüber Zytostatika gesteigert. Diese Analysen sind grundlegend für die Entwicklung neuer gezielter Therapieansätze zur Behandlung des malignen Melanoms.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden virusähnliche RNAs hinsichtlich ihrer Eignung als therapeutische Substanz beim malignen Melanom getestet. Die Präsenz virusähnlicher RNAs im Zytosol von malignen sowie nicht-malignen Zellen (Fibroblasten, Keratinozyten und Melanozyten) resultierte in der transkriptionellen Induktion des proapoptotischen Proteins Noxa, ein endogener Inhibitor der antiapoptotischen Proteine Mcl-1 und A1. Wie auch die siRNA-vermittelte Hemmung dieser Proteine führte die Induktion des endogenen Inhibitors in Melanomzellen, nicht aber in nicht-malignen Hautzellen, zum Zelltod. Durch diese Analysen wurden virusähnliche RNAs als aussichtsreiche therapeutische Substanzen zur Behandlung des malignen Melanoms identifiziert.

Das antiapoptotische Protein Bcl-xL wurde als das Protein identifiziert, welches nicht-maligne Zellen vor der Apoptose schützt, während Melanomzellen diese Art von Schutzmechanismus verloren zu haben scheinen.

Das zugrundeliegende transkriptionelle Programm der Noxa-Induktion durch virusähnliche RNAs konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht komplett aufgeklärt werden. Es wurde gezeigt dass die Noxa-Induktion unabhängig von den Transkriptionsfaktoren p53, HIF1 α , NF- κ B, IRF-1, IRF-3 und CREB1 ist. Luziferase-Reporteranalysen zeigten, dass die CRE- und IRF-Bindestellen im Noxa-Promotorbereich wichtig für die Noxa-Induktion durch virusähnliche RNAs sind. In weiteren Analysen müssen die Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die an diese Stellen binden können.

Im Folgenden werden die gewonnenen Erkenntnisse diskutiert und die klinische Relevanz der vorliegenden Arbeit erläutert.

4.1. Die Rolle antiapoptotischer Bcl-2-Proteine in Melanomzellen und nicht-malignen Hautzellen

Die Forschungen der letzten Jahrzehnte führten zu der Entwicklung neuer therapeutischer Verfahren, welche gezielt die Apoptoseresistenz in Tumorzellen angreifen. Diese neuen Strategien haben bereits in Form von TRAIL-Agonisten, SMAC-Mimetika oder Bcl-2-Antagonisten Anwendung in der Klinik gefunden. Die Entwicklung der Bcl-2-Antagonisten, wie der niedermolekularen Substanz ABT-737, basierte auf Expressionsstudien und funktionellen Analysen der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine in verschiedenen Tumoren.

4.1.1. Expressionsanalyse antiapoptotischer Bcl-2-Proteine

Die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse der Expression antiapoptotischer Bcl-2-Proteine zeigte, dass verschiedene Zelltypen ein spezifisches Expressionsmuster aufweisen. Dieses Expressionsmuster war jeweils für Fibroblasten, Keratinozyten und Melanozyten auch im Vergleich zwischen Linien von verschiedenen Spendern gleichförmig. Hingegen zeigten Melanomzellen unterschiedlicher Progressionsstufen kein einheitliches Expressionsmuster antiapoptotischer Proteine. Im Vergleich zu Melanozyten zeigten sich deutliche Unterschiede, jedoch wurde kein antiapoptotisches Protein identifiziert, welches überwiegend in Melanomzellen überexprimiert wurde. Eine Korrelation mit der Tumorprogression wurde nicht beobachtet. Vielmehr war häufig ein Verlust antiapoptotischer Proteine in Melanomzellen, im Vergleich zu Melanozyten zu beobachten. Beispielsweise waren die Proteine Bcl-2, Bcl-w und A1 in einigen Melanomzelllinien geringer exprimiert als in normalen Melanozyten. Die Expression antiapoptotischer Proteine wurde bereits in anderen Studien untersucht und führte zu kontroversen Ergebnissen. Zum Einen wurde berichtet, dass Bcl-2 im Melanom verglichen mit nicht-malignen melanozytären Läsionen hochreguliert ist [98, 99], während andere Studien keinen Unterschied zwischen der Bcl-2-Expression in Melanozyten und Melanomzellen feststellen konnten [100-102]. Weitere Studien wiederum zeigten sogar ein inverses Verhältnis zwischen Tumorprogression und Bcl-2-Expression [55, 103, 104].

Für das veränderte Expressionsmuster in Melanomzellen könnte die genomische Instabilität von Tumorzellen verantwortlich sein. Während der Tumorentstehung und Progression erwerben Tumorzellen durch genetische und epigenetische Veränderungen Eigenschaften, die die Formation malignen Gewebes ermöglichen. Initiale genetische Veränderungen, wie aktivierende Mutationen im Ras-Raf-Kinase-Signalweg, können zur vermehrten DNA-Replikation führen. Es gibt Hinweise, dass dieser Onkogen-induzierte Replikationsstress oder auch der Verlust von Tumorsuppressorgenen wie p53 zur genomischen Instabilität führt, welche nahezu in allen Tumoren und auch im Melanom nachweisbar ist [105-107]. Diese genomische Instabilität resultiert in der Akkumulation der genetischen Veränderungen, die den tumortypischen Phänotyp charakterisieren. Jedoch stellen genetische Veränderungen zufällige Ereignisse dar und es können demnach auch Mutationen

stattfinden, die dem Tumor keinen Überlebensvorteil vermitteln, wie beispielsweise der Verlust oder die verminderten Expression antiapoptotischer Proteine.

Ausserdem stellt die genomische Instabilität wie die Onkogen-Aktivierung ein Stresssignal dar, die in der Aktivierung proapoptotischer Signalwege resultieren kann. Beispielsweise führt die MYC-Aktivierung in Fibroblasten zur Induktion von Apoptose [30]. Tumorzellen haben Mechanismen entwickelt, diesen proapoptotischen Signalen entgegen zu wirken, sodass die Aktivierung proapoptotischer Signalwege entweder verhindert wird oder nicht im Vollzug des Zelltodes resultiert. Die geringe Expression antiapoptotischer Proteine in Melanomzellen kann ein Hinweis dafür sein, dass proapoptotische Signalwege aktiviert sind und das Überleben der Zellen von einzelnen antiapoptotischen Proteinen abhängt (*Abbildung 24*). Diese Situation bietet Angriffspunkte für therapeutische Strategien, da Melanomzellen sensibler reagieren können als nicht-maligne Zellen.

4.1.2. Melanomspezifische Zelltodinduktion durch das gezielte Angreifen von Mcl-1 und A1

Die Hypothese, dass Melanomzellen sensibler auf den Verlust einzelner antiapoptotischer Proteine reagieren als nicht-maligne Hautzellen, wurde durch den in dieser Arbeit durchgeführten RNAi-Screen bestätigt. Durch das systematische Ausschalten einzelner antiapoptotischer Proteine wurde gezeigt, dass in Melanomzellen Apoptose allein durch den Verlust von Mcl-1 oder A1 induziert wird, während der Verlust dieser einzelnen Proteine keinen Einfluss auf das Überleben von primären humanen Fibroblasten hat. Ohne einen zusätzlichen Apoptose-Stimulus induziert die Hemmung antiapoptotischer Proteine bereits Apoptose. Um den tumorassoziierten Stress (wie Onkogen-Aktivierung oder vermehrte DNA-Replikation) auszubalancieren, scheint das Überleben von Melanomzellen von der Expression der antiapoptotischen Proteine Mcl-1 und A1 abhängig zu sein (*Abbildung 24*).

Die funktionelle Rolle von A1 im malignen Melanom wurde erstmals in dieser Arbeit gezeigt. Die Rolle von Mcl-1 in Tumorprogression und Therapieresistenz des Melanoms wurde bereits in anderen Studien untersucht. Mcl-1 vermittelt beispielsweise die Resistenz von Melanomzellen gegenüber Anoikis [108], einer besonderen Form der Apoptose, die durch veränderte Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktionen induziert wird. Anoikis stellt somit einen intrinsischen Schutzmechanismus dar, das Abwandern von Zellen aus ihrem Zellverband zu verhindern. Demnach ist die Resistenz gegenüber Anoikis eine wichtige Voraussetzung für die Invasion, Migration und Metastasierung von Tumorzellen. Die Rolle von Mcl-1 in der Therapieresistenz kann am Beispiel von ABT-737 veranschaulicht werden. Erst die Hemmung von Mcl-1 sensibilisiert Melanomzellen für die Behandlung mit ABT-737, während die alleinige Behandlung keinen Einfluss zeigt (siehe Punkt 3.1.2.2. und [109]).

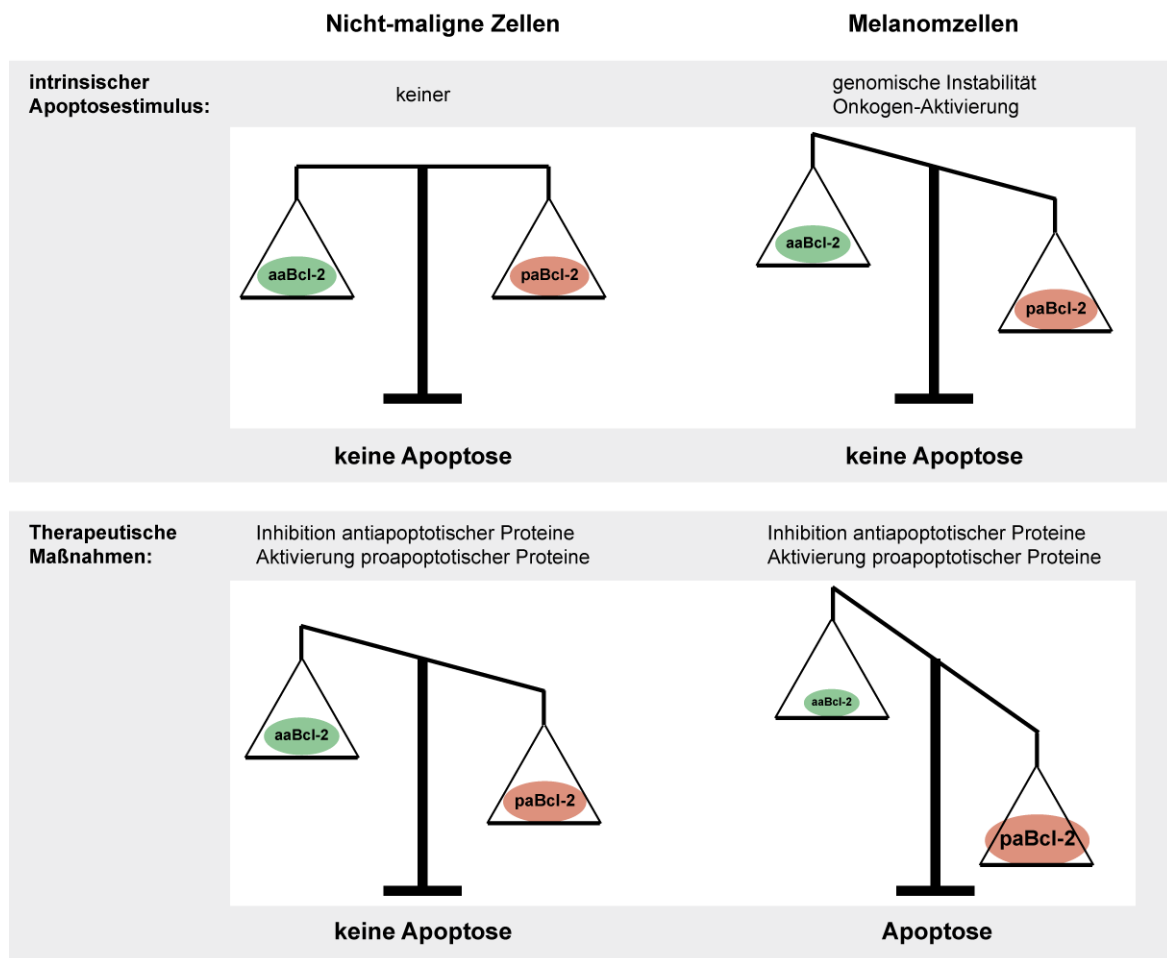


Abbildung 24: Schematische Darstellung: Unterschiedliche Apoptoseinduktion in nicht-malignen Zellen und Melanomzellen

In gesunden, nicht-malignen Zellen sind antiapoptotische und proapoptotische Moleküle im Gleichgewicht (oben links). In Melanomzellen führen intrinsische Apoptosesignale wie genomische Instabilität oder die Aktivierung von Onkogenen zu einer Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung Apoptose (oben rechts). Apoptose wird nicht initiiert, da nicht genügend proapoptotische Signale aktiviert oder aber antiapoptotische Kompensationsmechanismen induziert sind.

Durch therapeutische Maßnahmen, wie der Inhibition antiapoptotischer oder der Aktivierung proapoptotischer Proteine wird das Gleichgewicht in nicht-malignen Zellen wie auch in Melanomzellen in Richtung Apoptose verschoben. Nicht-maligne Zellen können die Apoptose allerdings umgehen, da nicht genügend proapoptotische Signale aktiviert oder aber antiapoptotische Kompensationsmechanismen induziert sind (unten links). In Melanomzellen hingegen stellen die therapeutischen Maßnahmen weitere Apoptosesignale dar, die zusätzlich zu den intrinsischen Apoptosestimuli wirken und Apoptose wird induziert.

Abkürzungen: aaBcl-2: antiapoptotische Bcl-2-Proteine; paBcl-2: proapoptotische Bcl-2-Proteine

Es wurden im Melanom und in anderen Tumoren bereits Screens durchgeführt, welche die Rolle antiapoptotischer Proteine untersucht haben. Hier wurden entweder BH3-Peptide oder niedermolekulare Wirkstoffe verwendet, welche bestimmte BH3-only-Proteine imitieren und die antiapoptotischen Proteine hemmen [110, 111]. Auch RNAi-Experimente wurden durchgeführt, um die Rolle spezieller antiapoptotischer Proteine in verschiedenen Tumoren zu charakterisieren oder das Ansprechen auf neue therapeutische Strategien zu untersuchen [112, 113]. Dennoch existieren erstaunlich wenige Studien, die den Effekt der Behandlung im Vergleich zu nicht-malignen Zellen untersucht haben, was aus therapeutischer Perspektive von enormer Wichtigkeit ist, um unerwünschte toxische

Nebenwirkungen zu vermeiden. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen wurden primäre Hautzellen mit Melanomzellen verglichen, um die Tumorspezifität des Ansatzes sicherzustellen. Als nicht-maligner Zelltyp wurden primäre humane Fibroblasten gewählt. Fibroblasten kommen im Organismus ubiquitär vor und stellen somit ein repräsentatives Modellsystem dar. Auf die Verwendung von Melanozyten wurde einerseits aus technischen Gründen verzichtet, da die Transfektionseffizienz der Zellen sehr gering ist und somit eine siRNA-vermittelte Hemmung spezifischer Gene oft nicht erzielt wird. Weiterhin sollte, im Hinblick auf die Melanomtherapie die Schädigung von Melanozyten durch therapeutische Strategien den Organismus nicht signifikant beeinflussen, da Melanozyten bei der Erhaltung des Organismus eine eher untergeordnete Rolle spielen. Vielmehr ist auf den Erhalt von Zellen zu achten, die essentielle physiologische Funktionen steuern.

Bereits in den Experimenten mit ABT-737 hat sich gezeigt, dass die Untersuchung von nicht-malignen Zellen von besonderer Bedeutung ist, denn durch die gleichzeitige Inhibition von mehreren antiapoptotischen Proteinen wird nicht nur in Melanomzellen, sondern auch in Fibroblasten Apoptose induziert. Die Inhibition von Mcl-1 sensibilisierte Fibroblasten gleichermaßen wie Melanomzellen für die Behandlung mit ABT-737. Obwohl also durch das gleichzeitige Angreifen mehrerer antiapoptotischer Proteine eine starke Apoptoseinduktion erzielt werden kann, scheint nicht jeder Ansatz für die Therapie geeignet zu sein, da eine tumorspezifische Zelltodinduktion nicht immer erzielt werden kann. Demzufolge ist ein genaues Verständnis der Sensitivität von malignem und nicht-malignem Gewebe von großer Bedeutung für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze, wie beispielsweise den BH3-Mimetika, die in der Regel mehrere antiapoptotische Proteine neutralisieren.

Die gezielte Inhibition zweier antiapoptotischer Proteine mittels RNAi zeigte, dass Apoptose in humanen Fibroblasten induziert wird wenn Bcl-xL zusammen mit Mcl-1 gehemmt wird. Weiterhin resultierte die Hemmung von Bcl-xL zusammen mit Bcl-w im Zelltod. Jedoch war nach dieser Behandlung eine Induktion des proapoptotischen BH3-only-Proteins Noxa zu beobachten, welches Mcl-1 und A1 neutralisiert. Der Mechanismus der Noxa-Induktion wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht und dieser Ansatz in den weiteren Analysen nicht mehr berücksichtigt. Melanomzellen hingegen zeigten, wie bereits bei der Hemmung einzelner antiapoptotischer Proteine beobachtet, eine höhere Sensitivität gegenüber dem Verlust antiapoptotischer Proteine. Die Zelltodrate konnte in vielen Kombinationen durch die gleichzeitige Hemmung zweier antiapoptotischer Proteine tumorspezifisch gesteigert werden. Da die alleinige Behandlung von Melanomzellen mit ABT-737 keinen Effekt zeigte, wurden die Ansätze ohne Mcl-1 und ohne A1 nicht näher untersucht. Die Inhibition von A1 allein resultierte in 30% und die Hemmung von Mcl-1 allein in 40% apoptotischen und toten Zellen. Eine signifikante, tumorspezifische Steigerung der Apoptose durch eine kombinierte Hemmung wurde nur erzielt, wenn Mcl-1 zusammen mit A1 gehemmt wurde (60% apoptotisch und tote Zellen). Durch das gleichzeitige Ausschalten von Mcl-1 und A1 kann also effektiv Apoptose spezifisch in Melanomzellen induziert werden. Der Effekt der Mcl-1- und A1-Hemmung wurde weiterhin in Keratinozyten und Melanomzelllinien verschiedener Progressionsstufen untersucht. So wurde in einer weiteren gesunden Zellart gezeigt, dass

diese Proteine für das Überleben nicht-malignen Gewebes entbehrlich sind, wohingegen durch die kombinierte Hemmung in allen untersuchten Melanomzelllinien effektiv Apoptose (60-90%) induziert wurde.

4.1.3. Die Hemmung von Mcl-1 und A1 in Kombination mit anderen therapeutischen Ansätzen

Van Delft et al. haben als Resistenzmechanismus gegenüber ABT-737 eine hohe Mcl-1-Expression beschrieben und die Kombination aus Mcl-1-Inaktivierung und ABT-737 als Therapieansatz vorgeschlagen, um diese Resistenz zu überwinden [114]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Mcl-1-Hemmung Melanomzellen gleichermaßen wie Fibroblasten für ABT-737 sensibilisiert. Es existieren auch Studien, die zeigen, dass eine hohe A1-Expression eine Resistenz gegenüber ABT-737 vermitteln kann [114, 115]. Da A1 im Melanom grundsätzlich exprimiert ist, wurde untersucht, ob die Hemmung von A1 Melanomzellen für die Behandlung mit ABT-737 sensibilisiert. In Fibroblasten wurde die Apoptoserate durch die kombinierte Therapie nicht deutlich erhöht, während in 1205Lu-Melanomzellen eine Steigerung der Apoptose beobachtet wurde. Diese Wirkung ließ sich aber in weiteren Melanomzelllinien (WM3211, WM239A) nicht zeigen. Demzufolge scheint allein Mcl-1 und nicht A1 im Melanom die Resistenz gegenüber ABT-737 zu vermitteln, und eine Kombination der ABT-737-Therapie mit A1- oder Mcl-1-Hemmung ist vermutlich als therapeutischer Ansatz zur tumorspezifischen Sensibilisierung ungeeignet.

Durch die gleichzeitige Hemmung von Mcl-1 und A1 wird in Melanomzelllinien ein effizientes Absterben der Zellen erzielt. Jedoch überleben einige Zellen die Behandlung und 6 Tage nach Transfektion mit Mcl-1- und A1-siRNA sind noch etwa 20% der Zellen am Leben und es sind keine apoptotische oder tote Zellen nachweisbar. Die Chemotherapie stellt einen zusätzlichen Apoptosestimulus dar, der unterschiedliche apoptotische Signalwege aktiviert, die unabhängig von Mcl-1 oder A1 wirken können.

Die Kombination der Mcl-1- und A1-Hemmung mit dem Zytostatikum 5-FU resultierte in einer gesteigerten Apoptoserate in Melanomzellen, die die Hemmung der antiapoptotischen Proteine überlebten. Durch die kombinierte Therapie aus A1-Mcl-1-Hemmung und 5-FU-Exposition wurden 90% der Melanomzellen eliminiert. Fibroblasten hingegen waren resistent gegenüber den einzelnen Ansätzen und der Kombination der Behandlungen. Demnach kann die A1/Mcl-1-Hemmung mit anderen therapeutischen Ansätzen kombiniert werden, wobei der tumorspezifische Effekt erhalten bleibt.

4.1.4. Mcl-1 und A1 als therapeutische Angriffspunkte: Klinisches Potential und Ausblick

Das maligne Melanom ist ein aggressiver Tumor, der eine hohe Resistenz gegenüber der konventionellen Strahlen- und Chemotherapie zeigt. Um eine möglichst hohe Ansprechrates zu gewährleisten, werden in der Klinik oft kombinierte Therapieverfahren gewählt, wie die Polychemo- oder Chemoimmuntherapie. Da die gewählten Therapeutika nicht gezielt

Tumorzellen angreifen, sondern auch nicht-malignes Gewebe schädigen, sind diese Ansätze meist von starken toxischen Nebenwirkungen begleitet und deshalb nur begrenzt einsetzbar. Neuere, zielgerichtete Ansätze (die sogenannte „*targeted therapy*“) haben das Ziel, spezifisch die Funktion eines Moleküls zu beeinflussen, welches an der Pathogenese beteiligt ist. Hierdurch wird eine höhere Wirksamkeit bei geringeren Nebenwirkungen erwartet. Ein Beispiel für einen solchen zielgerichteten Ansatz zur Behandlung des Melanoms stellen die spezifischen B-Raf-Inhibitoren dar, welche gezielt mutierte Formen der Kinase inhibieren. Diese haben in klinischen Studien eine erstaunlich hohe Wirksamkeit gezeigt [65], doch sind, wegen der Ermittlung von Resistenzmechanismen, aggressive Rezidive zu beobachten [66, 67].

Das gezielte Eingreifen in apoptotische Signalwege stellt einen Mechanismus dar, die Resistenz zu überwinden. Die Bcl-2-Proteinfamilie reguliert die Apoptose primär über Protein-Protein-Interaktionen zwischen pro- und antiapoptotischen Familienmitgliedern. Die Interaktionen sind therapeutisch durch Bcl-2-Antagonisten, den sogenannte BH3-Mimetika, beeinflussbar. Diese niedermolekularen Wirkstoffe imitieren BH3-only-Proteine und neutralisieren durch die Interaktion mit antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen deren Funktion. BH3-Mimetika haben bereits Anwendung in der Klinik gefunden. Derzeit werden einige klinische Studien durchgeführt, die beispielsweise die Wirkung von Navitoclax (auch ABT-263 genannt, die oral verfügbare Form des Wirkstoffes ABT-737) als Einzelsubstanz oder in der Kombinationstherapie mit chemotherapeutischen oder zielgerichteten Ansätzen in hämatologisch-onkologischen Erkrankungen oder soliden Tumoren untersuchen [116, 117] (weitere Studien unter: www.clinicaltrials.gov).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zeigen, dass Melanomzellen sensibler auf den Verlust antiapoptotischer Proteine reagieren als nicht-maligne Zellen. Die Analysen verdeutlichen, dass eine effektive tumorspezifische Zelltodinduktion durch das gezielte Ausschalten antiapoptotischer Proteine möglich ist. Die Proteine Mcl-1 und A1 wurden als geeignete Angriffspunkte identifiziert, da sie für das Überleben von Melanomzellen, nicht aber von nicht-malignen Zellen, essentiell sind. Weiterhin wurde die Apoptose durch zusätzliche Exposition gegenüber 5-FU melanomspezifisch gesteigert und resultierte in der Elimination von etwa 90% der Melanomzellen. Daher liefern die gewonnenen Erkenntnisse eine wichtige Grundlage für die Entwicklung neuer Bcl-2-Antagonisten für das maligne Melanom. Niedermolekulare Wirkstoffe, die die BH3-Domäne von Noxa, dem endogenen Inhibitor von Mcl-1 und A1, imitieren können in Kombination mit anderen zielgerichteten Ansätzen deshalb von großem Interesse für die Melanomtherapie sein.

4.2. Virusähnliche RNAs führen zur melanomspezifischen Apoptoseinduktion

Das proapoptotische Protein Noxa ist ein endogener Inhibitor der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine Mcl-1 und A1. Noxa kann über die BH3-Domäne spezifisch mit Mcl-1 und A1 interagieren, wodurch diese die Aktivierung der proapoptotischen Bcl-2-Effektorproteine Bax

und Bak nicht mehr hemmen können. Nachdem Mcl-1 und A1 als therapeutische Angriffspunkte im Melanom identifiziert wurden, ist die Aktivierung des endogenen Inhibitors Noxa eine weitere Möglichkeit, melanomspezifisch Zelltod zu induzieren.

In der Literatur existieren Hinweise, dass Noxa eine wichtige Rolle in der virusinduzierten Apoptose spielt [75, 118]. Die Apoptose stellt einen Schlüsselmechanismus dar, den Wirtsorganismus vor viralen Infektionen zu schützen, denn die Elimination der infizierten Zelle verhindert eine Ausbreitung des Virus. Wird durch eine Virusinfektion das proapoptotische Protein Noxa induziert, so kann dies von therapeutischem Interesse für die Melanomtherapie sein.

In der vorliegenden Arbeit wurden synthetische RNAs, die 5'-triphosphatkonjugierte RNA (pppRNA) und poly(I:C) verwendet, um eine Virusinfektion zu simulieren, da der Einsatz intakter Viren als therapeutischer Ansatz ungeeignet ist. Einerseits haben Viren im Laufe der Evolution Strategien entwickelt, um der Apoptoseinduktion entgegenzuwirken und ihre Replikation so zu gewährleisten. Außerdem ist der Einsatz intakter Viren nicht kontrollierbar. Demnach ist einerseits die Menge an gebildeten Liganden für die zytosolischen Rezeptoren RIG-I und MDA-5 variabel, und außerdem ist eine systemische Infektion, die schwerwiegende Folgen haben kann, nicht auszuschließen. Weiterhin existieren Belege, dass Viren durch die zufällige Integration in das Genom transformierende Eigenschaften besitzen. Die verwendeten virusähnlichen RNAs stellen synthetische Liganden der zytosolischen Rezeptoren RIG-I und MDA-5 dar. In früheren Arbeiten wurde demonstriert, dass die Transfektion dieser RNAs eine virale Infektion simuliert und eine antivirale Immunantwort induziert wird [88-90]. Virale RNAs stellen also eine geeignete, kontrollierbare Alternative gegenüber dem Einsatz intakter Viren dar.

In dieser Arbeit wurde erstmals untersucht, ob die viralen RNAs geeignet sind, tumorspezifisch Apoptose zu induzieren. In *Abbildung 25* sind die erzielten Ergebnisse zusammengefasst schematisch dargestellt.

Die Transfektion von pppRNA oder poly(I:C) führte in allen getesteten Melanomzellen zu einer signifikanten Reduktion der Zellvitalität, während nicht-maligne Hautzellen weniger sensibel auf die Behandlung reagierten. Durch die Hemmung von Apaf-1 und Caspase 9, Schlüsselmolekülen der intrinsischen Apoptose, wurde gezeigt, dass der mitochondriale Apoptoseweg in diesen Zellen aktiviert ist, die Induktion der Apoptose also verantwortlich für die geringere Zellvitalität ist.

Die Analyse der BH3-only-Proteine ergab, dass Noxa sowie Puma durch die Behandlung mit pppRNA oder poly(I:C) induziert sind. Durch die gezielte Hemmung einzelner BH3-only-Proteine wurde nachgewiesen, dass Noxa für die Apoptoseinduktion in Melanomzellen essentiell ist. Die Hemmung von Puma, Bid, Bik, Bad oder Bim hatte hingegen keinen Einfluss auf die Zelltodinduktion. Diese Daten liefern eindeutige Hinweise für die wichtige Rolle von Noxa in der Apoptoseinduktion durch virusähnliche RNAs. Jedoch schließen diese Daten nicht aus, dass außer Noxa noch andere BH3-only-Proteine an der Apoptose beteiligt sind. Es gibt Berichte, dass einige BH3-only Proteine den Verlust anderer kompensieren

können. So könnte beispielsweise die siRNA-vermittelte Hemmung von Puma, Bim oder Bid durch andere BH3-only-Proteine überwunden werden [119].

4.2.1. Bcl-xL schützt nicht-maligne Zellen vor der Apoptoseinduktion durch virusähnliche RNAs

Eine interessante Beobachtung ist, dass die proapoptotischen Proteine Noxa und Puma auch in nicht-malignen Zellen durch virusähnliche RNAs induziert wurden, obwohl es in diesen Zellen nicht zur Apoptose kommt. Ähnlich wie durch die direkte Inhibition von Mcl-1 und A1 mittels siRNA resultiert also auch die Aktivierung des proapoptotischen Proteins Noxa in einer melanomspezifischen Apoptose.

Durch die gleichzeitige Behandlung von Keratinozyten oder Fibroblasten mit ABT-737 und den virusähnlichen RNAs konnte auch in diesen Zellen effektiv Apoptose ausgelöst werden. Demnach schienen die antiapoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w nicht-maligne Hautzellen vor der Zelltodinduktion zu schützen. Nähere Untersuchungen zeigten, dass Bcl-xL, nicht aber Bcl-2 oder Bcl-w die Noxa-Induktion kompensieren können, da nur die Hemmung von Bcl-xL Fibroblasten und Keratinozyten für virusähnliche RNAs sensibilisierte. Einen weiteren Hinweis für die wichtige Rolle von Bcl-xL lieferte die Analyse der Expression nach pppRNA- oder poly(I:C)-Gabe in Melanozyten. Die Exposition von Melanozyten mit pppRNA oder poly(I:C) führte zu einer Hochregulation von Bcl-xL, während in Melanomzellen dieser Effekt nicht beobachtet wurde.

Dies ist im Einklang mit einer Studie, die beschreibt, dass für die Zelltodinduktion in gesunden Zellen mindestens zwei spezifische antiapoptotische Bcl-2-Proteine neutralisiert werden müssen. Nur durch die gleichzeitige Inaktivierung von Mcl-1 und Bcl-xL wurde in diesen Zellen Apoptose induziert [119]. Auch die unter Punkt 3.1.2.3. beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass in primären Zellen Apoptose durch die gleichzeitige Hemmung von Mcl-1 und Bcl-xL induziert werden kann. Aus physiologischer Sicht stellt dieser Mechanismus einen wichtigen Schutz vor einer sofortigen Zelltodinduktion dar. Im Falle einer Virusinfektion ist dies von Bedeutung, um weitere Abwehrmechanismen wie die Produktion von Interferon zu initiieren und so ein massives Absterben aller infizierten Zellen zu verhindern. Die proapoptotischen Signale die durch eine Virusinfektion aktiviert werden brauchen demnach noch ein weiteres Signal, damit der Zelltod vollzogen wird. Die höhere Sensitivität von Melanomzellen gegenüber den virusähnlichen RNAs kann durch das Vorhandensein proapoptotischer Signale, wie der Onkogen-Aktivierung oder der genomischen Instabilität erklärt werden. Dies ist im Einklang mit anderen Studien, die zeigen, dass Tumorzellen durch den tumorassoziierten Stress sensibler auf bestimmte BH3-Peptide reagieren als nicht-maligne Zellen, ein Zustand der als „*primed by death*“ bezeichnet wird (Abbildung 24 und Abbildung 25) [110].

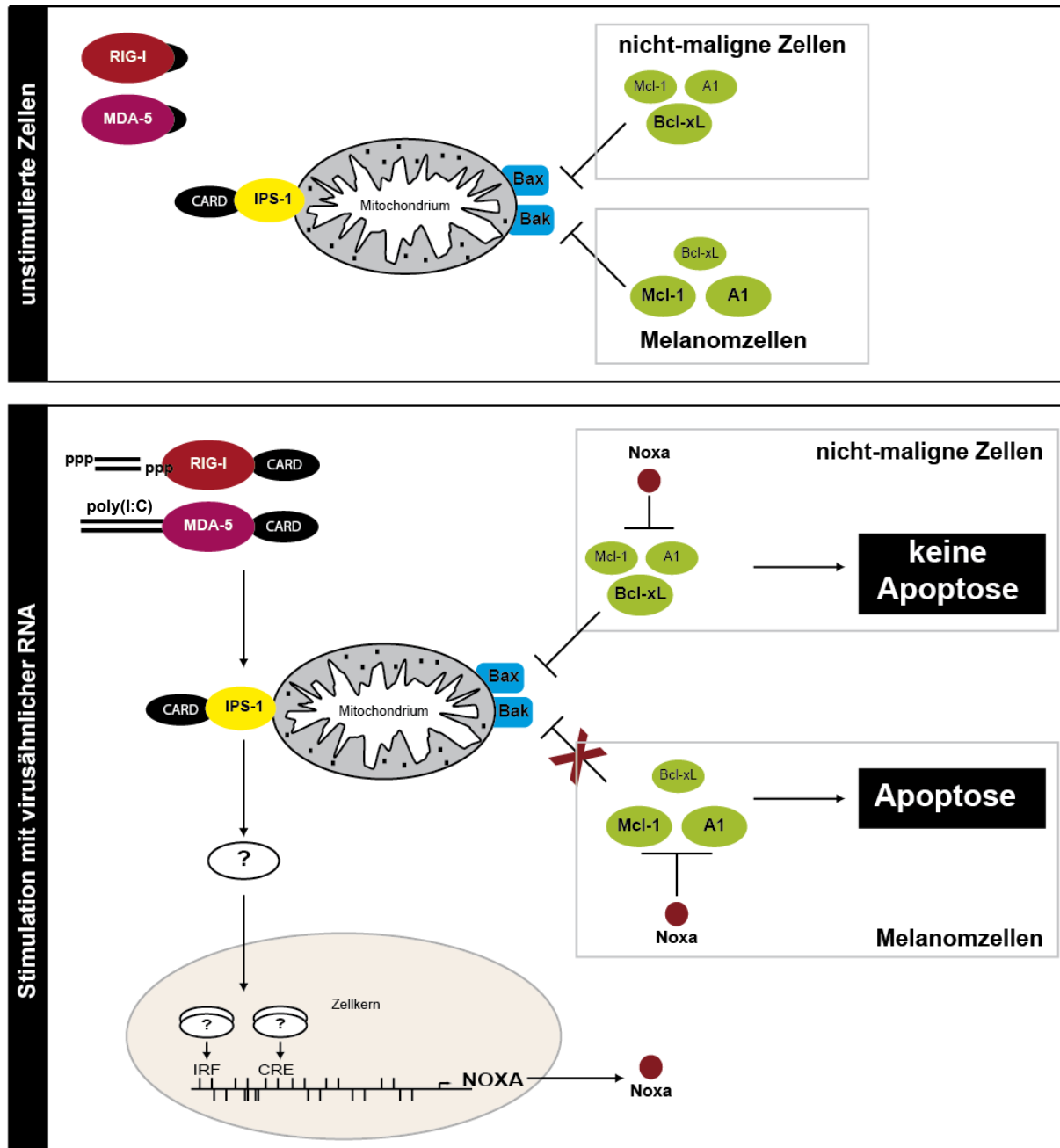


Abbildung 25: Schematische Darstellung des RIG-I und MDA-5 induzierten Apoptoseweges

Unstimulierte Zellen: Die zytosolischen Rezeptoren RIG-I und MDA-5 liegen inaktiv vor. Die mitochondriale Membranintegrität wird über ein Gleichgewicht an antiapoptotischen (wie Mcl-1, A1, Bcl-xL) und proapoptotischen (Bax, Bak) Proteinen geschützt. Melanomzellen zeigen gegenüber nicht-malignen Zellen ein verändertes Expressionsmuster antiapoptotischer Proteine.

Stimulation mit virusähnlichen RNAs: pppRNA oder poly(I:C) aktivieren RIG-I beziehungsweise MDA-5. Aktive Rezeptoren interagieren über die CARD-Domäne mit dem mitochondrialen Adapterprotein IPS-1. Durch diese Interaktion wird ein transkriptionelles Programm initiiert, welches zur transkriptionellen Induktion des proapoptotischen Proteins Noxa führt. Die beteiligten Transkriptionsfaktoren sind noch unbekannt, die CRE- und IRF-Bindestellen im Noxa-Promotor sind wichtig für die Noxa-Induktion. Noxa inhibiert die antiapoptotischen Proteine Mcl-1 und A1. In Melanomzellen führt diese Interaktion zur Aktivierung von Bax und Bak und somit zum Zelltod, während in nicht-malignen Zellen die Apoptose durch das antiapoptotische Protein Bcl-xL blockiert wird.

4.2.2. Transkriptionelle Regulation von Noxa nach Stimulation mit virusähnlichen RNAs

Da durch die Transfektion virusähnlicher RNAs eine Virusinfektion simuliert wird und die transkriptionelle Induktion von Noxa mit der virusinduzierten Apoptose assoziiert ist [75, 118], wurde untersucht, ob die Noxa-Induktion durch virusähnliche RNAs Parallelen zur virusinduzierten Noxa-Induktion aufweist.

Noxa und Puma wurden beide als transkriptionelle Zielgene des Tumorsuppressors p53 beschrieben [31, 32]. Der Tumorsuppressor p53 ist nur selten im Melanom mutiert und deshalb prinzipiell aktivierbar. Obwohl einige Hinweise existieren, dass p53 an der virusinduzierten Apoptose beteiligt ist [120], wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Noxa- sowie die Apoptoseinduktion durch virusähnliche RNAs unabhängig von p53 stattfinden. Hingegen war die transkriptionelle Hochregulation von Puma p53-abhängig. Durch die siRNA-vermittelte Hemmung von p53 wurde nach pppRNA Stimulation zwar Puma vermindert exprimiert, doch blieben Noxa- sowie Apoptoseinduktion unverändert. Im Konsens mit anderen Studien wurde hier gezeigt, dass Noxa unabhängig von p53 aktiviert werden kann [75].

HIF1 α stellt einen weiteren interessanten Transkriptionsfaktor dar, der für die Noxa-Induktion verantwortlich sein kann. Einerseits existieren Berichte, die zeigen, dass HIF1 α während einer viralen Infektion stabilisiert wird und die Ausbreitung der Virusinfektion hemmt [121]. Weiterhin ist Noxa als transkriptionelles Zielgen von HIF1 α beschrieben [92]. Die hier durchgeführten Analysen zeigen, dass Noxa nach der Stimulation mit virusähnlichen RNAs unabhängig von HIF1 α induziert wird.

Durch die virale Infektion wird über die zytosolischen Rezeptoren RIG-I und MDA-5 ein transkriptionelles Programm induziert, welches zur Aktivierung der antiviralen Immunantwort, also zur Induktion von Interferon und Zytokinen führt. Die wichtigsten Transkriptionsfaktoren, die diese Prozesse steuern, sind einerseits die der IRF-Familie und andererseits die NF- κ B - Transkriptionsfaktoren. Die *In-Silico*-Analyse des Noxa-Promotorbereichs zeigte, dass Bindestellen für NF- κ B-Transkriptionsfaktoren im Noxa-Promotor enthalten sind. Durch die Hemmung des kanonischen NF- κ B-Signalweges wurde hier gezeigt, dass die Noxa-Induktion unabhängig von dem kanonischen NF- κ B-Signalweg ist. Dies ist im Einklang mit anderen Studien, die zeigen, dass die virusinduzierte Apoptose unabhängig von NF- κ B stattfindet [122].

Durch die *In-Silico*-Analyse des Noxa-Promotorbereichs wurden weitere Bindestellen identifiziert, die für die transkriptionelle Induktion von Noxa nach einer Virusinfektion verantwortlich sein können. Luziferase-Reporter-Analysen ergaben, dass die IRF- und CRE-Bindestelle im Noxa-Promotorbereich wichtig für die transkriptionelle Induktion sind, während die p53-Bindestelle keinen Einfluss hatte. Dieselben Ergebnisse wurden in einer Studie erzielt, welche die Noxa-Induktion nach der Infektion mit dem Sendai-Virus, dem vesikulären Stomatitis-Virus oder dem Masern-Virus untersuchte [75]. In dieser Studie wurden IRF-1,

IRF-3 und CREB1 als an der transkriptionellen Regulation von Noxa nach viraler Infektion beteiligte Faktoren identifiziert. In der vorliegenden Arbeit hatten diese Faktoren aber keinen Einfluss auf die Noxa-Induktion. Weder die siRNA-vermittelte Hemmung von IRF-1 und IRF-3 noch von CREB1 verminderte die Noxa-Induktion nach pppRNA-Stimulation. Obwohl einige Hinweise existieren, dass beispielsweise IRF-3 an der virusinduzierten Apoptose beteiligt ist [75, 123], existieren auch Studien, die im Einklang mit den hier vorgestellten Ergebnissen zeigen, dass Noxa unabhängig von IRF-3 reguliert wird [122].

Die unterschiedlichen Ergebnisse in der Literatur bezüglich der Noxa-Induktion nach viraler Infektion sind möglicherweise auf den Einsatz intakter Viren zurückzuführen. Einerseits wird die Infektiosität und die Replikation des Virus durch Interferon gehemmt, wodurch die Menge der Liganden für RIG-I oder MDA-5 stark variieren können. Andererseits kann das Virus beispielsweise durch die Expression viraler Proteine Umgehungsstrategien aktivieren, welche den RIG-I- und MDA-5-Signalweg beeinflussen. Oft wurde in diesen Studien auch poly(I:C) anstatt intakter Viren verwendet. Jedoch wurde in diesem Fall kein Transfektionsreagenz eingesetzt, wodurch poly(I:C) nicht intrazellulär appliziert wurde [75]. Die extrazelluläre poly(I:C)-Gabe induziert andere transkriptionelle Programme als eine Virusinfektion [122]. Die antivirale Antwort wird in diesen Fällen nicht über RIG-I oder MDA-5 ausgelöst, wie dies nach der Infektion mit RNA-Viren oder nach Transfektion virusähnlicher RNAs der Fall ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das zugrundeliegende transkriptionelle Programm, das zur Noxa-Induktion nach Simulation einer Virusinfektion führt, nicht vollständig aufgeklärt. Jedoch konnten für die Noxa-Induktion notwendige Bindestellen im Noxa-Promotorbereich identifiziert werden (*Abbildung 25*). Diese Ergebnisse liefern eine Grundlage für weitere Analysen. Transkriptionsfaktoren, die an die CRE- oder IRF-Bindestellen im Noxa-Promotor binden können, wie Mitglieder der ATF/CREB-Familie oder der IRF-Familie werden in zukünftigen Arbeiten analysiert.

4.2.3. pppRNA als therapeutisches Molekül: Klinische Relevanz und Ausblick

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden virusähnliche RNAs hinsichtlich ihrer Eignung als therapeutische Moleküle zur Behandlung des malignen Melanoms geprüft. Hauptsächlich wurden die Apoptose induzierenden Eigenschaften intrazellulärer virusähnlicher RNAs untersucht und die zugrundeliegenden Signalwege analysiert. Es wurde gezeigt, dass intrazelluläre pppRNA und poly(I:C) die mitochondriale Apoptose über das proapoptotische Protein Noxa aktivieren, und die Noxa-Induktion zur melanomspezifischen Apoptoseinduktion führt. Diese Eigenschaft der virusähnlichen RNAs, tumorspezifisch Apoptose zu induzieren, stellt eine ideale Voraussetzung für einen möglichen Einsatz als therapeutische Substanz zur Behandlung des malignen Melanoms dar.

Da die Tumorentstehung und Progression komplexe Prozesse darstellen, die durch die Akkumulation genetischer und epigenetischer Veränderungen charakterisiert sind, weisen Tumorzellen oft eine Resistenz gegenüber einzelner zielgerichteter Ansätze, wie

beispielsweise der B-Raf-Inhibitoren, auf. Eine kombinierte Therapie, die gleichzeitig mehrere Eigenschaften des Tumors angreift, scheint geeignet, eine effektivere Tumorthherapie zu erzielen und intrinsische oder erworbene Resistenzen zu umgehen. Durch das spezielle Design der 5'-triphosphatkonjugierten RNA (pppRNA) können durch ein einziges therapeutisches Molekül drei Anti-Tumormechanismen aktiviert werden, die in *Abbildung 26* schematisch dargestellt sind. Neben der in dieser Arbeit beschriebenen Eigenschaft der pppRNA, tumorspezifisch Apoptose zu induzieren, wurde in anderen Studien der Arbeitsgruppe berichtet, dass die Transfektion der pppRNA zur Induktion von Typ-I-Interferonen (IFN) führt [124]. Durch die systemische IFN-Induktion nach Gabe von pppRNA werden natürliche Killerzellen aktiviert, die in dem untersuchten B16-Mausmelanommodell maßgeblich an der *In-Vivo*-Anti-Tumoraktivität der pppRNA beteiligt waren [124]. Demnach werden über die RIG-I-Aktivierung durch den 5'-Triphosphat-Anhang der verwendeten RNA gleichzeitig zwei Anti-Tumormechanismen aktiviert – die melanomspezifische Apoptoseinduktion und die Anti-Tumor-Immunantwort.

Da einerseits die RNA-Sequenz einen untergeordneten Einfluss auf die RIG-I-Aktivierung hat und weiterhin siRNAs trotz 5'-Triphosphat-Anhang funktionell sind, können beide biologische Aktivitäten in einem Molekül vereint werden [124]. Theoretisch kann jedes beliebige Gen, das an der Tumorentstehung und Progression beteiligt ist, mittels siRNA gehemmt werden. Die Hemmung geeigneter Zielgene stellt den dritten Anti-Tumormechanismus der pppRNA dar. Im Hinblick auf die Melanomtherapie wären folgende Zielgene interessante Angriffspunkte:

Der Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator Rezeptor (uPAR): Der uPAR-Rezeptor ist in eine Vielzahl biologischer Prozesse involviert, wie der Proteolyse, der Zelladhäsion und der Migration. Durch die proteolytische Aktivität sowie die Modulation der Zelladhäsion ist die uPAR-Expression mit einer erhöhten Invasivität und Metastasierung von Melanomzellen assoziiert. Entsprechend resultiert die Hemmung von uPAR in einer verminderten Invasivität und Metastasierung [125, 126]. Außerdem wurde gezeigt, dass die uPAR-Hemmung zur p53-abhängigen Apoptoseinduktion führt [127]. Demnach stellt die uPAR-Hemmung einen geeigneten Angriffspunkt für die Melanomtherapie dar.

Ein weiterer interessanter Ansatzpunkt ist die Inhibition mutierter Gene, die an der Melanomentstehung und Progression beteiligt sind. Die Inhibition der mutierten Form der B-Raf-Kinase, die in bis zu 60% aller Melanome mutiert ist, hat kürzlich erstaunliche Wirksamkeit gezeigt [65]. Jedoch war dieser Ansatz von Resistenzmechanismen gekennzeichnet [66, 67]. Die Kombination der B-Raf-Hemmung mit den Apoptose- und immunaktivierenden Eigenschaften der pppRNA, könnte ein interessanter Ansatzpunkt sein, die Resistenz gegenüber der B-Raf-Hemmung zu überwinden und die Therapie effektiver zu gestalten. Die gezielte Inhibition ausschließlich der mutierten Form eines Gens mittels siRNA ist selbst bei Vorliegen einer einzigen Punktmutation technisch möglich [128]. Es existieren erste klinische Studien, die eine solche Therapie zur Behandlung von erblichen Hautkrankheiten untersuchen [129].

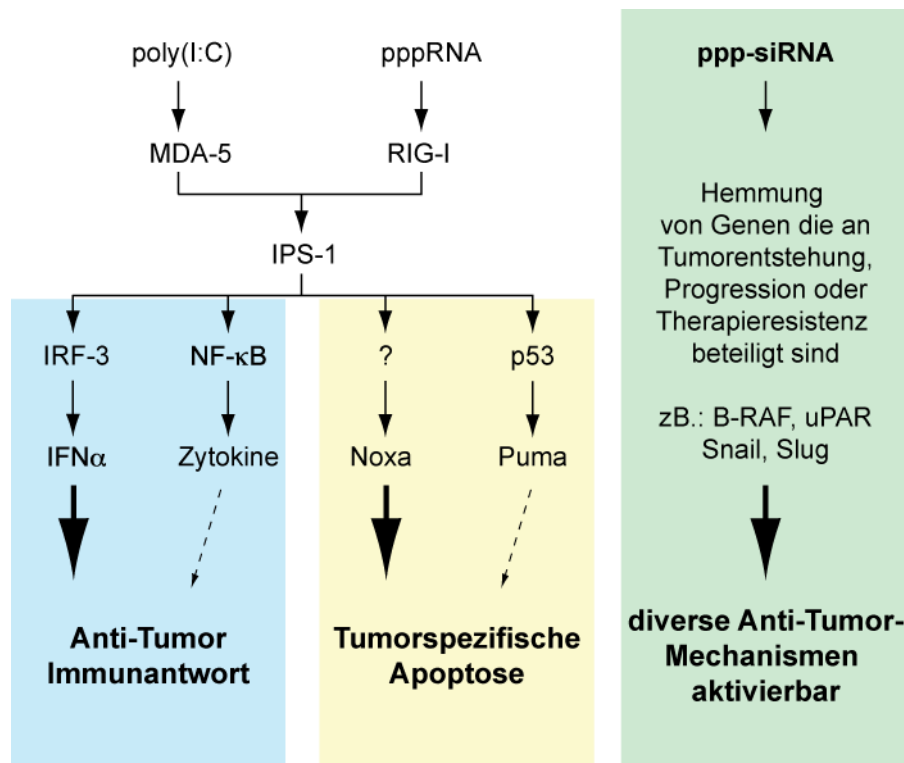


Abbildung 26: Schematische Darstellung der durch virusähnliche RNAs aktivierbaren Anti-Tumor-Mechanismen

Die virusähnlichen RNAs, poly(I:C) oder pppRNA, binden im Zytosol an die jeweiligen Rezeptoren, MDA-5 und RIG-I. Diese aktivieren über das Adapterprotein IPS-1 ein transkriptionelles Programm, welches über die Aktivierung von IRF-3 und NF-κB zur Induktion von Interferon und anderen Zytokinen führt, wodurch eine Anti-Tumor-Immunantwort ausgelöst wird. Weiterhin wird ein proapoptotisches Programm initiiert, welches über die Induktion von Noxa (und Puma) spezifisch in Melanomzellen zur Apoptose führt. Durch das spezielle Design der pppRNA kann durch die siRNA-vermittelte Genhemmung ein dritter Anti-Tumor-Mechanismus aktiviert werden. Potentielle Zielgene sind aufgeführt. Gestrichelte Pfeile zeigen an, dass eine Beteiligung der Proteine an dem Anti-Tumor-Mechanismus möglich aber nicht verifiziert ist.

Aufgrund der Aufklärung der diversen Signalwege, die an der Melanomentstehung und Progression beteiligt sind, können noch eine Vielzahl therapeutischer Zielgene aufgeführt werden. Beispielsweise ist AKT in 40-60% aller Melanome erhöht exprimiert (durch PTEN-Verlust oder genetische Amplifikation) [52]. Viele therapeutische Ansätze, die auf den AKT/mTOR-Signalweg abzielen werden derzeit zur Behandlung des Melanoms diskutiert und klinisch getestet [130, 131]. Weitere interessante Angriffspunkte stellen die transkriptionellen Repressoren Snail und Slug dar. Beide Faktoren spielen eine wichtige Rolle bei der Embryonalentwicklung, indem sie beispielsweise die Epitheliale-Mesenchymale-Transition steuern, die während der Embryonalentwicklung als auch in Tumorzellen beobachtet werden kann. Eine wichtige Funktion ist die Regulation der E-Cadherin-Expression. So ist die Snail-Expression im Melanom mit einer verminderten E-Cadherin-Expression korreliert [132]. Slug ist an der Entwicklung von Neuralleistenzellen beteiligt und obwohl Slug auch in normalen Melanozyten exprimiert ist, scheint Slug essentiell für die Invasion und Metastasierung des Melanoms [133]. Weiterhin wurde in einer Studie gezeigt, dass die Inhibition von Slug das Ansprechen von Melanomzellen auf chemotherapeutische

Ansätze erhöht [134]. Durch die Beteiligung der Faktoren an Invasion und Metastasierung des Melanoms stellen beide Transkriptionsfaktoren potentielle Angriffspunkte für die Therapie des Melanoms dar.

Derzeit existieren eine Vielzahl an Studien, welche die siRNA-Technologie zur Behandlung diverser Krankheitsbilder nutzen. Da die pppRNA strukturelle Eigenschaften mit siRNAs teilt und die Voraussetzungen für eine intrazelluläre Applikation ähnlich sind, können die Errungenschaften, die auf diesem Gebiet erzielt werden, für die Applikation der pppRNA genutzt werden. Bisher wurde die pppRNA als therapeutische Substanz in Mausmodellen des malignen Melanoms getestet. In diesen Modellen wurde die therapeutische Wirksamkeit als immunstimulatorische Substanz sowie die proapoptotische Funktion der pppRNA nachgewiesen [124, 135]. In diesen präklinischen Mausmodellen wurde die pppRNA an PEI komplexiert, um die intrazelluläre Applikation des Wirkstoffes zu gewährleisten. PEI alleine zeigte keinen Einfluss auf die Leukozyten-, Erythrozyten- oder Thrombozytenzahl, hingegen resultierte die Verabreichung der PEI-komplexierten pppRNA in Lymphozytopenie und Thrombozytopenie. Weitere toxische Effekte wurden nicht beobachtet. Die negativen Begleiterscheinungen der Behandlung sind höchstwahrscheinlich hauptsächlich auf eine IFN-Produktion zurückzuführen, die Folge einer RIG-I-Aktivierung ist. Kürzlich wurde eine Studie veröffentlicht, in der erstmals systemisch verabreichte siRNAs mittels speziellen Nanopartikeln gezielt in das Tumorgewebe von Melanompatienten appliziert werden konnten [136]. Durch eine solche zielgerichtete Administration der pppRNAs in das Tumorgewebe ist die IFN-Induktion auf den Tumor beschränkt, wodurch die Vorteile der Behandlung erhalten bleiben können, während die systemischen toxischen Nebeneffekte minimiert werden können.

Zusammenfassung

Der programmierte Zelltod, die Apoptose, ist ein Prozess, der in allen mehrzelligen Organismen stattfindet und für die Gewebshomöostase essentiell ist. Fehlregulationen in apoptotischen Signalwegen können zur Tumorentstehung beitragen. Da die meisten therapeutischen Ansätze, die derzeit in der Krebstherapie eingesetzt werden, auf der Induktion von Zelltod beruhen, können Fehlregulationen in apoptotischen Signalwegen auch für die Entwicklung von Therapieresistenzen verantwortlich sein.

Das Melanom ist ein hochgradig maligner Tumor, der bereits früh zur Metastasierung neigt und eine hohe Strahlen- und Chemotherapieresistenz aufweist. Selbst neue vielversprechende Behandlungsmethoden, wie die hoch wirksamen B-Raf-Inhibitoren, sind mit Resistenzmechanismen verbunden. Der gezielte Eingriff in apoptotische Signalwege birgt eine große Chance, die Apoptoseresistenz zu überwinden und das Therapieansprechen zu verbessern.

Es existieren zwei Hauptsignalwege, die Apoptose regulieren, der extrinsische (vermittelt durch sogenannte Todesrezeptoren) und der intrinsische (mitochondriale) Apoptoseweg. Die mitochondriale Apoptose wird durch die Bcl-2-Proteinfamilie reguliert. Antiapoptotische Bcl-2-Proteine (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 und A1) hemmen über Protein-Protein-Interaktionen die Aktivierung der proapoptotischen Bcl-2-Effektorproteine (Bax und Bak). Apoptotische Signale führen zur Aktivierung der proapoptotischen BH3-only-Proteine (beispielsweise Bim, Bid, Noxa, Puma oder Bad), welche wiederum mit pro- und antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen interagieren und so Apoptose initiieren. Basierend auf der Regulation des mitochondrialen Signalweges kann die Apoptoseinduktion bei einer Tumorzelle über drei unterschiedliche Mechanismen umgangen werden: Erstens kann die Aktivierung der Apoptose-initiierenden BH3-only-Proteine beeinträchtigt sein, beispielsweise durch Fehlregulationen in übergeordneten Signalwegen (p53-Inaktivierung). Zweitens können antiapoptotische Proteine überexprimiert sein (z.B. Bcl-2 in B-Zell-Lymphomen), was dem Tumor einen Überlebensvorteil verschafft. Drittens können proapoptotische Effektorproteine wie Bax und Bak mutiert sein.

Therapeutisch kann die mitochondriale Apoptose beispielsweise durch chemische Substanzen aktiviert werden, die antiapoptotische Bcl-2-Proteine hemmen. Diese sogenannten BH3-Mimetika imitieren die BH3-Domäne der proapoptotischen BH3-only-Proteine und neutralisieren durch Interaktion die Funktion antiapoptotischer Proteine. Auch die Aktivierung endogener proapoptotischer BH3-only-Proteine ist durch therapeutische Ansätze möglich. Da diese Apoptosemechanismen in allen Zellen vorhanden sind, müssen therapeutische Verfahren auf hohe Spezifität abzielen, damit Tumorzellen eliminiert werden, ohne gesundes Gewebe zu beeinträchtigen.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Expression und Funktion antiapoptotischer Bcl-2-Proteine untersucht, um potentielle Angriffspunkte zur Behandlung des malignen Melanoms zu identifizieren.

Expressionsanalysen in nicht-malignen Hautzellen (Fibroblasten, Keratinozyten und Melanozyten) zeigten ein zelltypspezifisches Expressionsmuster antiapoptotischer Bcl-2-Proteine. Der Vergleich zwischen Melanozyten und Melanomzellen verschiedener Progressionsstufen zeigte, dass das melanozytenspezifische Expressionsmuster in Melanomzellen stark verändert ist. Es wurde eine erhöhte und auch eine verminderte Expression antiapoptotischer Bcl-2-Proteine beobachtet. Dies war bei den untersuchten Melanomzelllinien unterschiedlich und es war kein melanomspezifisches Expressionsmuster erkennbar.

Zur funktionellen Untersuchung wurden siRNAs eingesetzt, um die Expression einzelner antiapoptotischer Proteine zu hemmen. In Fibroblasten hatte die Hemmung einzelner Bcl-2-Proteine keinen Einfluss auf das Überleben der Zellen. In Melanomzellen hingegen war das Überleben von der Expression einzelner antiapoptotischer Proteine abhängig. Die Hemmung von Mcl-1 oder A1 induzierte ohne weiteren apoptotischen Stimulus in Melanomzellen effektiv Apoptose (40 bzw. 30% apoptotisch und tote Zellen). Die Hemmung von Bcl-2, Bcl-xL oder Bcl-w hingegen erhöhte die Apoptose nur minimal. Dies zeigt, dass beim Melanom ein tumorspezifischer Eingriff in apoptotische Signalwege möglich ist.

Des weiteren wurde untersucht, ob die Apoptose durch gleichzeitige Inhibition mehrerer antiapoptotischer Proteine gesteigert werden kann, ohne den tumorspezifischen Effekt zu verlieren. In nicht-malignen Fibroblasten führte die gleichzeitige Hemmung von Bcl-xL und Mcl-1, sowie Bcl-xL und Bcl-w zum Zelltod. Letztere Kombination wurde von einer Noxa-Induktion, dem endogenen Inhibitor von Mcl-1 und A1, begleitet. Die gleichen Versuche in Melanomzellen ergaben, dass diese sensibler auf den Verlust zweier antiapoptotischer Proteine reagierten als Fibroblasten. Die meisten Kombinationen induzierten effektiv Apoptose. Während bereits die Einzelhemmung von Mcl-1 oder A1 signifikant Apoptose in Melanomzellen induzierte, zeigten kombinierte Hemmungen mit Einschluss von Mcl-1 oder A1 eine noch mal deutlich erhöhte Apoptoserate. Die höchste tumorspezifische Apoptoseinduktion fand sich bei der gleichzeitigen Hemmung von Mcl-1 und A1 (60% apoptotisch und tote Zellen). In weiterführenden Analysen wurden die Ergebnisse in Keratinozyten, einem weiteren nicht-malignen Zelltyp, sowie in weiteren Melanomzelllinien verschiedener Progressionsstufen bestätigt. Die Hemmung von Mcl-1 und A1 führte auch in Keratinozyten nicht zur Apoptose. Hingegen wurde in allen untersuchten Melanomzelllinien effektiv Apoptose ausgelöst (60-90% apoptotisch und tote Zellen).

Schließlich wurde untersucht, ob die Induktion von Apoptose durch Mcl-1- und A1-Hemmung durch Chemotherapie weiter gesteigert werden kann. Die zusätzliche Exposition der Zellen gegenüber 5-Fluorouracil halbierte die Anzahl an Melanomzellen, die die Hemmung von A1 und Mcl-1 überlebt hatten (von 20% lebender Zellen auf 10%), während die Zellvitalität von Fibroblasten auch durch die kombinierte Behandlung nicht gesenkt wurde.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden virusähnliche RNAs hinsichtlich ihrer Eignung als therapeutische Moleküle zur Behandlung des malignen Melanoms getestet. Hierfür wurden triphosphatkonjugierte RNA-Oligonukleotide und das synthetische RNA-Analogon poly(I:C) eingesetzt.

In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass die intrazelluläre Exposition von virusähnlichen RNAs, pppRNA und poly(I:C), die Zellvitalität von Melanomzellen stark vermindert, wohingegen nicht-maligne Zellen (Fibroblasten, Keratinozyten, Melanozyten) diese Reaktion nicht zeigten. Durch die Hemmung von Schlüsselmolekülen apoptotischer Signalwege wurde nachgewiesen, dass die Transfektion virusähnlicher RNAs zur Aktivierung des mitochondrialen Apoptoseweges führt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen zeigten, dass die proapoptotischen BH3-only-Proteine Noxa und Puma transkriptionell induziert waren. Durch die Hemmung proapoptotischer BH3-only-Proteine wurde gezeigt, dass Noxa, nicht Puma, essentiell für die Apoptoseinduktion in Melanomzellen ist.

Interessanterweise war Noxa auch in nicht-malignen Zellen induziert, obwohl hier keine Apoptose ausgelöst wurde. Daher wurde untersucht, ob antiapoptotische Bcl-2-Moleküle der Induktion von Noxa entgegenwirken. Hierfür wurden nicht-maligne Zellen mit pppRNA oder poly(I:C) behandelt, bei denen Bcl-2, Bcl-xL oder Bcl-w durch siRNAs gehemmt wurde. Es zeigte sich, dass das antiapoptotische Protein Bcl-xL nicht-maligne Hautzellen vor der Apoptoseinduktion schützt. Die Hemmung von Bcl-xL, nicht aber von Bcl-2 oder Bcl-w, sensibilisierte Fibroblasten und Keratinozyten für die Apoptoseinduktion durch pppRNA und poly(I:C).

Weitere Untersuchungen zielten darauf ab, das zugrundeliegende transkriptionelle Programm aufzuklären, das zur Induktion von Noxa führt. Dies konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig aufgeklärt werden. Es wurde gezeigt, dass die Noxa-Induktion unabhängig von den Transkriptionsfaktoren p53, HIF1 α , NF- κ B, IRF-1, IRF-3 und CREB1 stattfindet. Reportergeranalysen zeigten, dass die IRF- und CRE- Bindestellen im Noxa-Promotorbereich wichtig für die transkriptionelle Regulation bei Stimulation mit virusähnlichen RNAs sind.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse tragen zum Verständnis der Apoptoseregulation im malignen Melanom bei und stellen eine Grundlage für die Entwicklung neuer therapeutischer Verfahren dar. Mcl-1 und A1 als Angriffspunkte scheinen von großem Interesse für die Melanomtherapie zu sein, da einerseits die siRNA-vermittelte Hemmung der Proteine, sowie andererseits die Aktivierung des endogenen Inhibitors Noxa zur melanomspezifischen Apoptose führt. Der Einsatz der pppRNA als therapeutisches Molekül eröffnet vielfältige Möglichkeiten, die Apoptoseresistenz des Melanoms zu überwinden. Das Potential der pppRNA als therapeutische Substanz wird in weiterführenden Arbeiten näher untersucht.

Literaturnachweis

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
2. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972 Aug;26(4):239-57.
3. Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature*. 2000;407(6805):796-801.
4. Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res*. 1999 Apr 1;59(7 Suppl):1701s-6s.
5. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:383-424.
6. Ho PK, Hawkins CJ. Mammalian initiator apoptotic caspases. *FEBS J*. 2005 Nov;272(21):5436-53.
7. Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*. 2003 Jan;10(1):76-100.
8. Wei Y, Fan T, Yu M. Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2008 Apr;40(4):278-88.
9. Srinivasula SM, Ashwell JD. IAPs: What's in a Name? *Molecular Cell*. 2008;30(2):123-35.
10. Andera L. Signaling activated by the death receptors of the TNFR family. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2009 Sep;153(3):173-80.
11. Danial NN. BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clin Cancer Res*. 2007 Dec 15;13(24):7254-63.
12. Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell*. 2002 Feb;9(2):423-32.
13. Kim HE, Du F, Fang M, Wang X. Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Dec 6;102(49):17545-50.
14. Yin Q, Park HH, Chung JY, Lin SC, Lo YC, da Graca LS, et al. Caspase-9 holoenzyme is a specific and optimal procaspase-3 processing machine. *Mol Cell*. 2006 Apr 21;22(2):259-68.
15. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*. 1984 Nov 30;226(4678):1097-9.
16. Häcker G, Weber A. BH3-only proteins trigger cytochrome c release, but how? *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2007;462(2):150-5.

17. Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, et al. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature*. 1996;381(6580):335-41.
18. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Jan;9(1):47-59.
19. Oltval ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993;74(4):609-19.
20. Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol*. 2003 Jan;39(11):615-47.
21. Suzuki M, Youle RJ, Tjandra N. Structure of Bax: Coregulation of Dimer Formation and Intracellular Localization. *Cell*. 2000;103(4):645-54.
22. Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2004;1644(2-3):83-94.
23. Willis SN, Adams JM. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*. 2005 Dec;17(6):617-25.
24. Puthalakath H, Strasser A. Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ*. 2002 May;9(5):505-12.
25. Giam M, Huang DCS, Bouillet P. BH3-only proteins and their roles in programmed cell death. *Oncogene*. 27(S1):S128-S36.
26. Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, et al. Bid-induced Conformational Change of Bax Is Responsible for Mitochondrial Cytochrome c Release during Apoptosis. *The Journal of Cell Biology*. 1999 March 8, 1999;144(5):891-901.
27. Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*. 2002;2(3):183-92.
28. Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR, et al. BH3 Domains of BH3-Only Proteins Differentially Regulate Bax-Mediated Mitochondrial Membrane Permeabilization Both Directly and Indirectly. *Molecular Cell*. 2005;17(4):525-35.
29. Cartron PF, Gallenne T, Bougras G, Gautier F, Manero F, Vusio P, et al. The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Mol Cell*. 2004 Dec 3;16(5):807-18.
30. Zindy F, Eischen CM, Randle DH, Kamijo T, Cleveland JL, Sherr CJ, et al. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev*. 1998 Aug 1;12(15):2424-33.
31. Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*. 2001 Mar;7(3):683-94.

32. Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*. 2000 May 12;288(5468):1053-8.
33. Hockenbery D, Nunez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*. 1990;348(6299):334-6.
34. Strasser A, Harris AW, Bath ML, Cory S. Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature*. 1990;348(6299):331-3.
35. Deng J, Carlson N, Takeyama K, Dal Cin P, Shipp M, Letai A. BH3 profiling identifies three distinct classes of apoptotic blocks to predict response to ABT-737 and conventional chemotherapeutic agents. *Cancer Cell*. 2007 Aug;12(2):171-85.
36. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*. 2002 Apr;2(4):277-88.
37. Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends. Saarbrücken; Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch-Institut (RKI); 2006 Report No.: ISBN: 3-9808880-3-7
38. Bishop JN, Harland M, Randerson-Moor J, Bishop DT. Management of familial melanoma. *Lancet Oncol*. 2007 Jan;8(1):46-54.
39. de Snoo FA, Kroon MW, Bergman W, ter Huurne JA, Houwing-Duistermaat JJ, van Mourik L, et al. From sporadic atypical nevi to familial melanoma: risk analysis for melanoma in sporadic atypical nevus patients. *J Am Acad Dermatol*. 2007 May;56(5):748-52.
40. Garbe C, Blum A. Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2001 Sep-Oct;14(5):280-90.
41. Miller AJ, Mihm MC, Jr. Melanoma. *N Engl J Med*. 2006 Jul 6;355(1):51-65.
42. Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, et al. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol*. 2001 Aug 15;19(16):3622-34.
43. Stang A, Stang K, Stegmaier C, Hakulinen T, Jockel KH. Skin melanoma in Saarland: incidence, survival and mortality 1970-1996. *Eur J Cancer Prev*. 2001 Oct;10(5):407-15.
44. Clark WH, Jr., Elder DE, Guerry Dt, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol*. 1984 Dec;15(12):1147-65.
45. Mancianti ML, Herlyn M. Tumor progression in melanoma: the biology of epidermal melanocytes in vitro. *Carcinog Compr Surv*. 1989;11:369-86.
46. Kyrgidis A, Tzello TG, Triaridis S. Melanoma: Stem cells, sun exposure and hallmarks for carcinogenesis, molecular concepts and future clinical implications. *J Carcinog*. 9:3.

47. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, et al. High frequency of B-RAF mutations in nevi. *Nat Genet.* 2003 Jan;33(1):19-20.
48. Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, et al. B-RAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature.* 2005 Aug 4;436(7051):720-4.
49. Aitken J, Welch J, Duffy D, Milligan A, Green A, Martin N, et al. CDKN2A variants in a population-based sample of Queensland families with melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Mar 3;91(5):446-52.
50. Robertson GP. Functional and therapeutic significance of Akt deregulation in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 2005 Jun;24(2):273-85.
51. Wu H, Goel V, Haluska FG. PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene.* 2003 May 19;22(20):3113-22.
52. Stahl JM, Sharma A, Cheung M, Zimmerman M, Cheng JQ, Bosenberg MW, et al. Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res.* 2004 Oct 1;64(19):7002-10.
53. Soengas MS, Capodici P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, et al. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature.* 2001 Jan 11;409(6817):207-11.
54. McGill GG, Horstmann M, Widlund HR, Du J, Motyckova G, Nishimura EK, et al. Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell.* 2002 Jun 14;109(6):707-18.
55. Tang L, Tron VA, Reed JC, Mah KJ, Krajewska M, Li G, et al. Expression of apoptosis regulators in cutaneous malignant melanoma. *Clin Cancer Res.* 1998 Aug;4(8):1865-71.
56. Carvalho L, Lipay M, Belfort F, Santos I, Andrade J, Haddad A, et al. Telomerase activity in prognostic histopathologic features of melanoma. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2006;59(9):961-8.
57. Zamolo G, Coklo M, Bosnar A, Batinac T. The relationship between telomerase activity and proliferation in cutaneous melanoma. *Med Hypotheses.* 2007;68(1):125-7.
58. Czubayko F, Schulte AM, Berchem GJ, Wellstein A. Melanoma angiogenesis and metastasis modulated by ribozyme targeting of the secreted growth factor pleiotrophin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Dec 10;93(25):14753-8.
59. Adams MS, Gammill LS, Bronner-Fraser M. Discovery of transcription factors and other candidate regulators of neural crest development. *Dev Dyn.* 2008 Apr;237(4):1021-33.
60. Brooks PC, Strömblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, et al. Localization of Matrix Metalloproteinase MMP-2 to the Surface of Invasive Cells by Interaction with Integrin $\alpha_5\beta_3$. *Cell.* 1996;85(5):683-93.
61. Hsu M, Andl T, Li G, Meinkoth JL, Herlyn M. Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression. *J Cell Sci.* 2000 May;113 (Pt 9):1535-42.

62. Balch CM, Soong S-J, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, et al. Prognostic Factors Analysis of 17,600 Melanoma Patients: Validation of the American Joint Committee on Cancer Melanoma Staging System. *Journal of Clinical Oncology*. 2001 August 15, 2001;19(16):3622-34.
63. Kirkwood J, Strawderman M, Ernstoff M, Smith T, Borden E, Blum R. Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. *Journal of Clinical Oncology*. 1996 January 1, 1996;14(1):7-17.
64. Meyer T, Merkel S, Goehl J, Hohenberger W. Surgical therapy for distant metastases of malignant melanoma. *Cancer*. 2000;89(9):1983-91.
65. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, et al. Inhibition of mutated, activated B-RAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010 Aug 26;363(9):809-19.
66. Johannessen CM, Boehm JS, Kim SY, Thomas SR, Wardwell L, Johnson LA, et al. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature*. 2010 Dec 16;468(7326):968-72.
67. Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature*. 2010 Dec 16;468(7326):973-7.
68. Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol*. 2006 Sep 10;24(26):4340-6.
69. Hodi FS, Friedlander P, Corless CL, Heinrich MC, MacRae S, Kruse A, et al. Major response to imatinib mesylate in KIT-mutated melanoma. *J Clin Oncol*. 2008 Apr 20;26(12):2046-51.
70. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*. 2002 Jan 25;108(2):153-64.
71. Bedikian AY, Millward M, Pehamberger H, Conry R, Gore M, Trefzer U, et al. Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group. *J Clin Oncol*. 2006 Oct 10;24(29):4738-45.
72. Winkler J, Stessl M, Amartei J, Noe CR. Off-target effects related to the phosphorothioate modification of nucleic acids. *ChemMedChem*. Aug 2;5(8):1344-52.
73. Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*. 2005 Jun 2;435(7042):677-81.
74. Chauhan D, Velankar M, Brahmandam M, Hideshima T, Podar K, Richardson P, et al. A novel Bcl-2/Bcl-X(L)/Bcl-w inhibitor ABT-737 as therapy in multiple myeloma. *Oncogene*. 2007 Apr 5;26(16):2374-80.
75. Lallemand C, Blanchard B, Palmieri M, Lebon P, May E, Tovey MG. Single-stranded RNA viruses inactivate the transcriptional activity of p53 but induce NOXA-dependent

- apoptosis via post-translational modifications of IRF-1, IRF-3 and CREB. *Oncogene*. 2007 Jan 18;26(3):328-38.
76. Kuss AW, Knodel M, Berberich-Siebelt F, Lindemann D, Schimpl A, Berberich I. A1 expression is stimulated by CD40 in B cells and rescues WEHI 231 cells from anti-IgM-induced cell death. *Eur J Immunol*. 1999 Oct;29(10):3077-88.
77. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998 Feb 19;391(6669):806-11.
78. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001 Jan 18;409(6818):363-6.
79. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 2000 Mar 16;404(6775):293-6.
80. Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol*. 2004 Mar;22(3):326-30.
81. Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, Haraguchi T, Ohki-Hamazaki H, Juni A, et al. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(3):936-48.
82. Gruber CA, Rhee JM, Gleiberman A, Turner EE. POU domain factors of the Brn-3 class recognize functional DNA elements which are distinctive, symmetrical, and highly conserved in evolution. *Molecular and cellular biology*. 1997 May;17(5):2391-400.
83. Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res*. 1995 Dec 11;23(23):4878-84.
84. Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, et al. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics*. 2005 Jul 1;21(13):2933-42.
85. Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, et al. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell*. 2005 Feb 4;17(3):393-403.
86. Van Triest B, Pinedo HM, Giaccone G, Peters GJ. Downstream molecular determinants of response to 5-fluorouracil and antifolate thymidylate synthase inhibitors. *Ann Oncol*. 2000 Apr;11(4):385-91.
87. Thompson AJ, Locarnini SA. Toll-like receptors, RIG-I-like RNA helicases and the antiviral innate immune response. *Immunol Cell Biol*. 2007 Aug-Sep;85(6):435-45.
88. Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzozka K, Jung A, Kato H, et al. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science*. 2006 Nov 10;314(5801):994-7.
89. Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, Weber F, et al. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science*. 2006 Nov 10;314(5801):997-1001.

90. Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, Hirai R, Kawai T, Matsushita K, et al. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med*. 2008 Jul 7;205(7):1601-10.
91. Nikiforov MA, Riblett M, Tang WH, Gratchouck V, Zhuang D, Fernandez Y, et al. Tumor cell-selective regulation of NOXA by c-MYC in response to proteasome inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Dec 4;104(49):19488-93.
92. Kim JY, Ahn HJ, Ryu JH, Suk K, Park JH. BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1alpha. *J Exp Med*. 2004 Jan 5;199(1):113-24.
93. Martin AG, Trama J, Crichton D, Ryan KM, Fearnhead HO. Activation of p73 and induction of Noxa by DNA damage requires NF-kappa B. *Aging (Albany NY)*. 2009 Mar;1(3):335-49.
94. O'Prey J, Crichton D, Martin AG, Vousden KH, Fearnhead HO, Ryan KM. p53-mediated induction of Noxa and p53AIP1 requires NFkappaB. *Cell Cycle*. Mar 1;9(5):947-52.
95. Kuhnel F, Zender L, Paul Y, Tietze MK, Trautwein C, Manns M, et al. NFkappaB mediates apoptosis through transcriptional activation of Fas (CD95) in adenoviral hepatitis. *J Biol Chem*. 2000 Mar 3;275(9):6421-7.
96. Inta I, Paxian S, Maegele I, Zhang W, Pizzi M, Spano P, et al. Bim and Noxa Are Candidates to Mediate the Deleterious Effect of the NF- κ B Subunit RelA in Cerebral Ischemia. *The Journal of Neuroscience*. 2006 December 13, 2006;26(50):12896-903.
97. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation Meets Ubiquitination: The Control of NF- κ B Activity. *Annual Review of Immunology*. 2000;18(1):621-63.
98. Leiter U, Schmid RM, Kaskel P, Peter RU, Krahn G. Antiapoptotic bcl-2 and bcl-xL in advanced malignant melanoma. *Arch Dermatol Res*. 2000 May;292(5):225-32.
99. Utikal J, Leiter U, Udart M, Kaskel P, Peter RU, Krahn GM. Expression of c-myc and bcl-2 in primary and advanced cutaneous melanoma. *Cancer Invest*. 2002;20(7-8):914-21.
100. Cerroni L, Soyer HP, Kerl H. bcl-2 protein expression in cutaneous malignant melanoma and benign melanocytic nevi. *Am J Dermatopathol*. 1995 Feb;17(1):7-11.
101. Plettenberg A, Ballaun C, Pammer J, Mildner M, Strunk D, Weninger W, et al. Human melanocytes and melanoma cells constitutively express the Bcl-2 proto-oncogene in situ and in cell culture. *Am J Pathol*. 1995 Mar;146(3):651-9.
102. Selzer E, Schlagbauer-Wadl H, Okamoto I, Pehamberger H, Potter R, Jansen B. Expression of Bcl-2 family members in human melanocytes, in melanoma metastases and in melanoma cell lines. *Melanoma Res*. 1998 Jun;8(3):197-203.
103. Tron VA, Krajewski S, Klein-Parker H, Li G, Ho VC, Reed JC. Immunohistochemical analysis of Bcl-2 protein regulation in cutaneous melanoma. *Am J Pathol*. 1995 Mar;146(3):643-50.
104. van den Oord JJ, Vandeghinste N, De Ley M, De Wolf-Peeters C. Bcl-2 expression in human melanocytes and melanocytic tumors. *Am J Pathol*. 1994 Aug;145(2):294-300.

105. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Mar;11(3):220-8.
106. Bastian BC, Olshen AB, LeBoit PE, Pinkel D. Classifying melanocytic tumors based on DNA copy number changes. *Am J Pathol.* 2003 Nov;163(5):1765-70.
107. Bastian BC, Xiong J, Frieden IJ, Williams ML, Chou P, Busam K, et al. Genetic changes in neoplasms arising in congenital melanocytic nevi: differences between nodular proliferations and melanomas. *Am J Pathol.* 2002 Oct;161(4):1163-9.
108. Boisvert-Adamo K, Longmate W, Abel EV, Aplin AE. Mcl-1 is required for melanoma cell resistance to anoikis. *Mol Cancer Res.* 2009 Apr;7(4):549-56.
109. Keuling AM, Felton KE, Parker AA, Akbari M, Andrew SE, Tron VA. RNA silencing of Mcl-1 enhances ABT-737-mediated apoptosis in melanoma: role for a caspase-8-dependent pathway. *PLoS One.* 2009;4(8):e6651.
110. Certo M, Del Gaizo Moore V, Nishino M, Wei G, Korsmeyer S, Armstrong SA, et al. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell.* 2006 May;9(5):351-65.
111. Placzek WJ, Wei J, Kitada S, Zhai D, Reed JC, Pellecchia M. A survey of the anti-apoptotic Bcl-2 subfamily expression in cancer types provides a platform to predict the efficacy of Bcl-2 antagonists in cancer therapy. *Cell Death Dis.* May;1(5):e40.
112. Zhang L, Lopez H, George NM, Liu X, Pang X, Luo X. Selective involvement of BH3-only proteins and differential targets of Noxa in diverse apoptotic pathways. *Cell Death Differ.* May;18(5):864-73.
113. Brotin E, Meryet-Figuière M, Simonin K, Duval RE, Villedieu M, Leroy-Dudal J, et al. Bcl-XL and MCL-1 constitute pertinent targets in ovarian carcinoma and their concomitant inhibition is sufficient to induce apoptosis. *International Journal of Cancer.* 126(4):885-95.
114. van Delft MF, Wei AH, Mason KD, Vandenberg CJ, Chen L, Czabotar PE, et al. The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell.* 2006 Nov;10(5):389-99.
115. Yecies D, Carlson NE, Deng J, Letai A. Acquired resistance to ABT-737 in lymphoma cells that up-regulate MCL-1 and BFL-1. *Blood.* Apr 22;115(16):3304-13.
116. Andrew Krivoshik M, PhD, Abbott. A Phase 1/2a Study Evaluating the Safety, Pharmacokinetics, and Efficacy of ABT-263 in Subjects With Small Cell Lung Cancer (SCLC) or Other Non-Hematological Malignancies. 2011 February 2011 [cited; Available from: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00445198?term=navitoclax&rank=16>
117. Mack Mabry M, Abbott. Safety Study of ABT-263 in Combination With Paclitaxel in Subjects With Solid Tumors. 2011 March 22, 2011 [cited; Available from: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00891605?term=navitoclax&rank=12>
118. Sun Y, Leaman DW. Involvement of Noxa in cellular apoptotic responses to interferon, double-stranded RNA, and virus infection. *J Biol Chem.* 2005 Apr 22;280(16):15561-8.

119. Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, et al. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev.* 2005 Jun 1;19(11):1294-305.
120. Takaoka A, Hayakawa S, Yanai H, Stoiber D, Negishi H, Kikuchi H, et al. Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature.* 2003 Jul 31;424(6948):516-23.
121. Hwang, II, Watson IR, Der SD, Ohh M. Loss of VHL confers hypoxia-inducible factor (HIF)-dependent resistance to vesicular stomatitis virus: role of HIF in antiviral response. *J Virol.* 2006 Nov;80(21):10712-23.
122. Elco CP, Guenther JM, Williams BR, Sen GC. Analysis of genes induced by Sendai virus infection of mutant cell lines reveals essential roles of interferon regulatory factor 3, NF-kappaB, and interferon but not toll-like receptor 3. *J Virol.* 2005 Apr;79(7):3920-9.
123. Chattopadhyay S, Marques JT, Yamashita M, Peters KL, Smith K, Desai A, et al. Viral apoptosis is induced by IRF-3-mediated activation of Bax. *EMBO J.* May 19;29(10):1762-73.
124. Poeck H, Besch R, Maihoefer C, Renn M, Tormo D, Morskaya SS, et al. 5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma. *Nat Med.* 2008 Nov;14(11):1256-63.
125. Marconi C, Bianchini F, Mannini A, Mugnai G, Ruggieri S, Calorini L. Tumoral and macrophage uPAR and MMP-9 contribute to the invasiveness of B16 murine melanoma cells. *Clin Exp Metastasis.* 2008;25(3):225-31.
126. Rofstad EK, Rasmussen H, Galappathi K, Mathiesen B, Nilsen K, Graff BA. Hypoxia promotes lymph node metastasis in human melanoma xenografts by up-regulating the urokinase-type plasminogen activator receptor. *Cancer Res.* 2002 Mar 15;62(6):1847-53.
127. Besch R, Berking C, Kammerbauer C, Degitz K. Inhibition of urokinase-type plasminogen activator receptor induces apoptosis in melanoma cells by activation of p53. *Cell Death Differ.* 2007 Apr;14(4):818-29.
128. Hickerson RP, Smith FJ, Reeves RE, Contag CH, Leake D, Leachman SA, et al. Single-nucleotide-specific siRNA targeting in a dominant-negative skin model. *J Invest Dermatol.* 2008 Mar;128(3):594-605.
129. Leachman SA, Hickerson RP, Schwartz ME, Bullough EE, Hutcherson SL, Boucher KM, et al. First-in-human mutation-targeted siRNA phase Ib trial of an inherited skin disorder. *Mol Ther.* Feb;18(2):442-6.
130. Amaravadi RK, Flaherty KT. Targeted therapy for metastatic melanoma. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2007 May;5(5):386-94.
131. Sullivan RJ, Atkins MB. Molecular-targeted therapy in malignant melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2009 May;9(5):567-81.
132. Poser I, Dominguez D, de Herreros AG, Varnai A, Buettner R, Bosserhoff AK. Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail. *J Biol Chem.* 2001 Jul 6;276(27):24661-6.

133. Gupta PB, Kuperwasser C, Brunet JP, Ramaswamy S, Kuo WL, Gray JW, et al. The melanocyte differentiation program predisposes to metastasis after neoplastic transformation. *Nat Genet.* 2005 Oct;37(10):1047-54.
134. Vannini I, Bonafe M, Tesei A, Rosetti M, Fabbri F, Storci G, et al. Short interfering RNA directed against the SLUG gene increases cell death induction in human melanoma cell lines exposed to cisplatin and fotemustine. *Cell Oncol.* 2007;29(4):279-87.
135. Besch R, Poeck H, Hohenauer T, Senft D, Hacker G, Berking C, et al. Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells. *J Clin Invest.* 2009 Aug;119(8):2399-411.
136. Davis ME, Zuckerman JE, Choi CH, Seligson D, Tolcher A, Alabi CA, et al. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature.* Apr 15;464(7291):1067-70.

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
AN	Annexin V
BH-Domäne	Bcl-2-Homologie-Domäne
BIR-Domäne	<i>Baculovirus IAP Repeat</i>
bp / kb	Basenpaar / Kilobasen
BSA	Bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CARD	Caspase- Rekrutierungs-Domäne
cDNA	copy DNA
CRE	<i>cAMP response element</i>
Cyt c	Cytochrom c
DISC	<i>Death-inducing Signaling Complex</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
E-Box	<i>Enhancer-Box</i>
E2F	<i>E2 binding factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	<i>Fluorescence associated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
FKHD	<i>Forkhead transcription factors</i>
FKS	Fetales Kälber Serum
HMGS-2	<i>Human Melanocyte Growth Supplement</i>
HRE	<i>Hypoxia response element</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IAPs	<i>Inhibitor of Apoptosis Proteins</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
LEF	<i>Lymphoid enhancer factor</i>
luc	Luziferase
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
mRNA	messenger RNA
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
nt	Nukleotid
P53	Protein 53
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i>
PEI	Polyethylenimin
PI	Propidiumiodid

PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
poly(I:C)	<i>Polyinosinic-polycytidylic acid</i>
pppRNA	5'triphosphatkonjugierte RNA
PTN	Pleiotrophin
RGP	<i>radial growth phase</i>
RISC	<i>RNAi-induced Silencing Complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SP1	<i>Specificity protein 1</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TERT	Telomerase
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TM	Transmembrandomäne
VGP	<i>vertical growth phase</i>

Danksagung

Mit den folgenden Zeilen möchte ich mich bei allen bedanken, die maßgeblich am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren.

Besonderer Dank gilt Prof. Carola Berking und PD Dr. Robert Besch, die gemeinsam diese Arbeit betreut haben. Robert Besch möchte ich insbesondere für die Bereitstellung des interessanten Themas, seine vielfältige Unterstützung durch seine immerwährende Diskussionsbereitschaft, seine produktiven Anregungen und seinen ansteckenden Enthusiasmus danken. Bei Carola Berking möchte ich mich über die wissenschaftliche Betreuung hinaus für die finanzielle Unterstützung und vor allem für die schnellen Korrekturen und kritischen Kommentare hinsichtlich der Präsentation meiner wissenschaftlichen Daten bedanken.

Für die persönliche Unterstützung und das gute Verhältnis innerhalb der Arbeitsgruppe danke ich meinen Betreuern, sowie dem gesamten Labor für Zelladhäsion. Besonders Claudia Kammerbauer möchte ich für ihre Unterstützung in allen methodischen Fragen und für die beispielhafte Organisation des Labors herzlich danken.

Prof. Simon Rothenfusser möchte ich für seinen Einsatz als Ko-Mentor danken. Seine Bereitschaft, meine Arbeit im Anschluss an die Nachtschicht zu diskutieren, schätze ich hoch.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. Martin Irmeler für die Durchführung der *In-Silico*-Analysen des Noxa-Promotors.

Mein Dank gilt auch dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der LMU München Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas Ruzicka für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Labor für Zelladhäsion.

Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Stefan Endres für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg 1202: „Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie“. Bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) möchte ich mich für die Finanzierung des Kollegs bedanken.

Für die nicht-wissenschaftliche Unterstützung und zeitweilige Ablenkung während dieser Arbeit danke ich all meinen Kollegen, meinen Freunden und meiner Familie, insbesondere meiner Schwester Stefanie, meiner Nichte Sabina und Birgit Oppenheimer.

Meinen Eltern danke ich herzlich für ihre fortwährende, liebevolle Unterstützung und ihr Interesse an meiner Arbeit.